

(19) 日本国特許庁 (J P)

## (12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平8-507436

(43) 公表日 平成8年(1996)8月13日

(51) Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I
C 1 2 N 15/09	Z N A		
A 6 1 K 39/35	A B F	9284-4C	
39/395	D	9284-4C	
C 1 2 N 1/21		8828-4B	
		9162-4B	
		C 1 2 N 15/00	Z N A A
	審査請求 未請求	予備審査請求 有	(全 168 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平6-516036  
 (86) (22) 出願日 平成5年(1993)12月30日  
 (85) 翻訳文提出日 平成7年(1995)6月30日  
 (86) 国際出願番号 P C T / U S 9 3 / 1 2 4 6 8  
 (87) 国際公開番号 W O 9 4 / 1 6 0 6 8  
 (87) 国際公開日 平成6年(1994)7月21日  
 (31) 優先権主張番号 0 7 / 9 9 9 , 7 1 2  
 (32) 優先日 1992年12月31日  
 (33) 優先権主張国 米国 (U S)  
 (31) 優先権主張番号 0 8 / 1 5 6 , 5 4 9  
 (32) 優先日 1993年11月22日  
 (33) 優先権主張国 米国 (U S)

(71) 出願人 イミューロジック ファーマスーティカル  
 コーポレイション  
 アメリカ合衆国 02154 マサチューセッ  
 ツ, ウォルサム, リンカン ストリート  
 610  
 (72) 発明者 モーゲンスターン, ジェイ ビー,  
 アメリカ合衆国 02116 マサチューセッ  
 ツ, ボストン, マールボロ ストリート  
 322  
 (74) 代理人 弁理士 倉内 基弘 (外1名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 犬の鱗屑由来のアレルゲン性蛋白質及びペプチド並びにそれらの利用

## (57) 【要約】

Canis familiarisのアレルゲンCanf I又はCanf IIをコードする単離された核酸を開示する。Canf I活性及び予想分子量約19,200ダルトンを有するペプチドをコードするcDNAをも記載する。Canf II活性及び予想分子量約18,200ダルトンを有するペプチドをコードするcDNAをも記載する。これらの核酸をプローブとして用いて、試料中のCanf I若しくはCanf II核酸の存在を検出することが出来、又はCanf I若しくはCanf II活性を有するペプチドの組換え産生のために用いることが出来る。Canf I若しくはCanf II活性を有するペプチドを薬剤投与に適した組成物又は犬鱗屑に対する感受性を診断する方法において用いることが出来る。

## 【特許請求の範囲】

1. 犬鱗屑アレルギー C a n f I の活性を有するペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む単離された核酸。
2. cDNA 配列である請求項 1 の単離された核酸。
3. cDNA が図 5 に示すヌクレオチド配列 (SEQ ID NO: 1) を含む請求項 2 の単離された核酸。
4. cDNA が図 5 に示すヌクレオチド配列 (SEQ ID NO: 1) のコード領域を含む請求項 2 の単離された核酸。
5. ペプチドが図 5 に示すアミノ酸配列 (SEQ ID NO: 2) を含む請求項 1 の単離された核酸。
6. ペプチドが図 5 に示す配列 (SEQ ID NO: 2) のアミノ酸残基 1 ~ 148 を含む請求項 5 の単離された核酸。
7. ペプチドが図 5 に示すアミノ酸配列 (SEQ ID NO: 2) を含む配列と少なくとも 50 % 相同である請求項 1 の単離された核酸。
8. ペプチドが、図 5 に示すアミノ酸配列 (SEQ ID NO: 2) を含むペプチドをコードする核酸に高い或は低い緊縮条件下でハイブリダイズする核酸によってコードされる請求項 1 の単離された核酸。
9. ペプチドが、少なくとも 10 アミノ酸の長さである請求項 1 の単離された核酸。
10. ペプチドが、少なくとも 20 アミノ酸の長さである請求項 1 の単離された核酸。
11. ペプチドが、少なくとも 25 アミノ酸の長さである請求項 1 の単離された核酸。
12. ペプチドが、少なくとも 30 アミノ酸の長さである請求項 1 の単離された核酸。
13. 少なくとも 20 アミノ酸残基又はそれ以上の長さを有しかつ図 5 に示す配列 (SEQ ID NO: 2) を含むアミノ酸配列と少なくとも約 50 % の同一性を有するペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む単離された DNA。

14. 犬鱗屑アレルギー C a n f II の活性を有するペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む単離された核酸。

15. cDNA 配列である請求項14の単離された核酸。

16. cDNA が図18に示すヌクレオチド配列 (SEQ ID NO: 67) を含む請求項15の単離された核酸。

17. cDNA が図18に示すヌクレオチド配列 (SEQ ID NO: 67) のコード領域を含む請求項15の単離された核酸。

18. ペプチドが図18に示すアミノ酸配列 (SEQ ID NO: 68) を含む請求項14の単離された核酸。

19. ペプチドが図18に示す配列 (SEQ ID NO: 68) のアミノ酸残基1~161を含む請求項18の単離された核酸。

20. ペプチドが図18に示すアミノ酸配列 (SEQ ID NO: 68) を含む配列と少なくとも50%相同である請求項14の単離された核酸。

21. ペプチドが、図18に示すアミノ酸配列 (SEQ ID NO: 68) を含むペプチドをコードする核酸に高い或は低い緊縮条件下でハイブリダイズする核酸によってコードされる請求項14の単離された核酸。

22. ペプチドが、少なくとも約10~20アミノ酸の長さである請求項14の単離された核酸。

23. ペプチドが、少なくとも約10~16アミノ酸の長さである請求項14の単離された核酸。

24. 少なくとも約10~16アミノ酸残基又はそれ以上の長さを有しかつ図18に示す配列 (SEQ ID NO: 68) を含むアミノ酸配列と少なくとも約50%の相同性を有するペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む単離されたDNA。

25. 請求項1の核酸を含む組換え発現ベクター。

26. 核酸がcDNAである請求項25の組換え発現ベクター。

27. cDNA が図5に示すヌクレオチド配列 (SEQ ID NO: 1) を含む請求項26の組換え発現ベクタ

一。

28. 請求項14の核酸を含む組換え発現ベクター。

29. 核酸がcDNAである請求項28の組換え発現ベクター。

30. cDNAが図18に示すヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 67)を含む請求項29の組換え発現ベクター。

31. Canf Iの活性を有するペプチドの発現を指令することができる請求項29の組換え発現ベクターによりトランスフェクトされた宿主細胞。

32. 真核細胞である請求項31の宿主細胞。

33. Canf Iの活性を有するペプチドの発現を指令することができる請求項27の組換え発現ベクターによりトランスフェクトされた宿主細胞。

34. 真核細胞である請求項33の宿主細胞。

35. Canf IIの活性を有するペプチドの発現を指令することができる請求項28の組換え発現ベクターによりトランスフェクトされた宿主細胞。

36. 真核細胞である請求項35の宿主細胞。

37. Canf IIの活性を有するペプチドの発現を指令することができる請求項30の組換え発現ベクターによりトランスフェクトされた宿主細胞。

38. 真核細胞である請求項37の宿主細胞。

39. 請求項31の宿主細胞を培地で培養してペプチドを発現させ、ペプチドを培養物から単離することを含む

Canf Iの活性を有するペプチドを生成する方法。

40. 請求項35の宿主細胞を培地で培養してペプチドを発現させ、ペプチドを培養物から単離することを含むCanf IIの活性を有するペプチドを生成する方法。

41. 請求項1の核酸の組換え発現によって産生された、犬鱗屑アレルギーCanf Iの活性を有する単離されたペプチド。

42. 請求項3の核酸の組換え発現によって産生された、犬鱗屑アレルギーCanf Iの活性を有する単離されたペプチド。

43. 請求項4の核酸の組換え発現によって産生された、犬鱗屑アレルギーCanf I

n f I の活性を有する単離されたペプチド。

44. 請求項13のDNAの組換え発現によって產生された、犬鱗屑アレルギー C a n f I の活性を有する単離されたペプチド。

45. 化学合成によって生成された、犬鱗屑アレルギー C a n f I の活性を有する単離されたペプチド。

46. 少なくとも約10～20アミノ酸の長さである請求項45の単離されたペプチド。

47. 少なくとも約10～16アミノ酸の長さである請求項46の単離されたペプチド。

48. 請求項14の核酸の組換え発現によって產生された、犬鱗屑アレルギー C a n f II の活性を有する単離されたペプチド。

49. 請求項16の核酸の組換え発現によって產生された、犬鱗屑アレルギー C a n f II の活性を有する単離されたペプチド。

50. 請求項17の核酸の組換え発現によって產生された、犬鱗屑アレルギー C a n f II の活性を有する単離されたペプチド。

51. 請求項24のDNAの組換え発現によって產生された、犬鱗屑アレルギー C a n f II の活性を有する単離されたペプチド。

52. 化学合成によって生成された、犬鱗屑アレルギー C a n f II の活性を有する単離されたペプチド。

53. 少なくとも約10～20アミノ酸の長さである請求項52の単離されたペプチド。

54. 少なくとも約10～16アミノ酸の長さである請求項52の単離されたペプチド。

55. C a n f I の活性を有する修飾されたペプチド。

56. 図5に示す C a n f I アミノ酸配列 (SEQ ID NO: 2) 中に存在する少なくとも1個のシステイン残基が別のアミノ酸残基で置換された請求項55の修飾されたペプチド。

57. 図5に示す C a n f I アミノ酸配列 (SEQ ID NO: 2) 中に存在

する少なくとも1個のシステイン残基がセリン残基で置換された請求項56の修飾されたペプチド。

58. 少なくとも1個のリシン残基がペプチドのアミノ

若しくはカルボキシ末端に或はアミノ及びカルボキシ両末端に加えられた請求項55の修飾されたペプチド。

59. C a n f IIの活性を有する修飾されたペプチド。

60. 図18に示すC a n f IIアミノ酸配列 (SEQ ID NO: 68) 中に存在する少なくとも1個のシステイン残基が別のアミノ酸残基で置換された請求項59の修飾されたペプチド。

61. 図18に示すC a n f IIアミノ酸配列 (SEQ ID NO: 68) 中に存在する少なくとも1個のシステイン残基がセリン残基で置換された請求項60の修飾されたペプチド。

62. 少なくとも1個のリシン残基がペプチドのアミノ若しくはカルボキシ末端に或はアミノ及びカルボキシ両末端に加えられた請求項59の修飾されたペプチド。

63. 犬鱗屑アレルギー C a n f I の活性を有するペプチドの実質的に純粋な製剤。

64. 犬鱗屑アレルギー C a n f II の活性を有するペプチドの実質的に純粋な製剤。

65. C a n f I の活性を有する少なくとも一種のペプチド及び製薬上許容し得るキャリアーを含む薬剤投与するのに適した組成物。

66. ペプチドが図5のアミノ酸配列 (SEQ ID NO: 2) を含む請求項65の組成物。

67. ペプチドが図5のアミノ酸残基1~148 (SEQ ID NO: 2) を含む請求項66の組成

物。

68. C a n f II の活性を有する少なくとも一種のペプチド及び製薬上許容し得

るキャリアーを含む薬剤投与するのに適した組成物。

69. ペプチドが図18のアミノ酸配列 (SEQ ID NO: 68) を含む請求項68の組成物。

70. ペプチドが図18のアミノ酸残基1~161 (SEQ ID NO: 68) を含む請求項69の組成物。

71. 請求項65の組成物を患者に投与することを含む、犬鱗屑アレルギーに感受性の患者におけるアレルギーへの感受性を治療する方法。

72. 請求項66の組成物を患者に投与することを含む、犬鱗屑アレルギーに感受性の患者におけるアレルギーへの感受性を治療する方法。

73. 患者から得られる血液試料に請求項41のペプチドを、血液成分とペプチドとを結合させるのに適した条件下で一緒にしかつそのような結合が起きる程度を求めることを含む、患者における犬鱗屑アレルギーへの感受性を検出する方法。

74. 結合が起きる程度を、T細胞機能、T細胞増殖、B細胞機能、血液中に存在する抗体への蛋白質の結合或はこれらの組合せを評価することによって求める請求項73の方法。

75. 請求項68の組成物を患者に投与することを含

む、犬鱗屑アレルギーに感受性の患者におけるアレルギーへの感受性を治療する方法。

76. 請求項69の組成物を患者に投与することを含む、犬鱗屑アレルギーに感受性の患者におけるアレルギーへの感受性を治療する方法。

77. 患者から得られる血液試料に請求項48のペプチドを、血液成分とペプチドとを結合させるのに適した条件下で一緒にしかつそのような結合が起きる程度を求めることを含む、患者における犬鱗屑アレルギーへの感受性を検出する方法。

78. 結合が起きる程度を、T細胞機能、T細胞増殖、B細胞機能、血液中に存在する抗体への蛋白質の結合或はこれらの組合せを評価することによって求める請求項77の方法。

- 79. 請求項 41 のペプチドと特異的に反応する抗体。
- 80. モノクローナル抗体である請求項 79 の抗体。
- 81. 請求項 44 のペプチドと特異的に反応する抗体。
- 82. モノクローナル抗体である請求項 81 の抗体。
- 83. 請求項 48 のペプチドと特異的に反応する抗体。
- 84. モノクローナル抗体である請求項 83 の抗体。
- 85. 請求項 51 のペプチドと特異的に反応する抗体。
- 86. モノクローナル抗体である請求項 85 の抗体。
- 87. 請求項 41 のペプチドと特異的に反応する T 細胞クローン。
- 88. 請求項 41 のペプチドと特異的に反応する可溶性

T 細胞レセプター。

- 89. 請求項 88 の T 細胞レセプターと特異的に反応する抗体。
- 90. モノクローナル抗体である請求項 89 の抗体。
- 91. 請求項 48 のペプチドと特異的に反応する T 細胞クローン。
- 92. 請求項 48 のペプチドと特異的に反応する可溶性 T 細胞レセプター。
- 93. 請求項 92 の T 細胞レセプターと特異的に反応する抗体。
- 94. モノクローナル抗体である請求項 93 の抗体。
- 95. SEQ ID NO: 105、SEQ ID NO: 106、SEQ ID NO: 107、SEQ ID NO: 108、及び SEQ ID NO: 109 からなる群より選ぶアミノ酸配列を含む、犬鱗屑アレルギー Can f I の活性を有する単離されたペプチド。



## 【発明の詳細な説明】

犬の鱗屑由来のアレルゲン性蛋白質  
及びペプチド並びにそれらの利用発明の背景

人口の約10%は、種々の環境起源の抗原にさらされることにより過剰感作（アレルギー性）となる。それらの即時型及び／又は遅延型の過敏症を誘発する抗原はアレルゲンとして知られている（King, T. P., (1976) Adv. Immunol., 23:77-105）。これらは、草、木、雑草、動物の鱗屑、昆虫、食物、薬物及び化学物質を含む。枯草熱、喘息及び発疹の症状を含むアトピー及びアナフィラキシー等の即時型アレルギー応答の進展においては、個人の遺伝的素因が役割を演じると考えられる（Young, R.P.等、(1990) Clin. Sci., 79:19a）。

アトピー性アレルギーに関係する抗体は、主として免疫グロブリンのIgEクラスに属する。IgEは、好塩基球、マスト細胞及び樹状細胞に特異的な高アフィニティーレセプターFcεRIを介して結合する（Kinet, J.P., (1990) Curr. Opin. Immunol., 2:499-505）。リガンドとして作用するアレルゲンと同系のレセプターIgEとの結合により、このIgEに結合したFcεRIは、その細胞表面で架橋されてIgE-アレルゲン相互作用の生理的明示を生じる。これらの生理的効果は、他の物質

のうちで、ヒスタミン、セロトニン、ヘパリン、エオシン好性白血球に対する走化性因子及び／又はロイコトリエンC<sub>4</sub>、D<sub>4</sub>及びE<sub>4</sub>（これらは、気管支平滑筋の長期の収縮を引き起こす）の放出を含む（Hood, L.E.等、Immunology（第2版）、The Benjamin/Cummings Publishing Co., Inc. (1984)）。それ故に、アレルゲンとIgEとの相互作用の最終的な結果は、上記のメディエーターの放出により引き起こされるアレルギー性症状である。かかる症状は、その性質において、抗原が侵入した経路及びIgEのマスト細胞若しくは好塩基球への付着パターンによって、全身性であり又は局所的であり得る。局所的明示は、一般に、アレルゲンが侵入した部位の上皮表面に起きる。全身性効果は、循環（血管内）抗原に対するIgE-好塩基球応答から生じるアナフィラキシー（アナフィラキシ

一性ショック)を誘導し得る。

ペットの犬 (*Canis familiaris*) は、世界中の家庭で飼われている。通常的に犬が飼われている家及び公立学校においては、犬の鱗屑のアレルゲンが塵試料中に検出され得る (Wood, R.A.等 (1988) Am Rev Respir.Dis., 137:358-363及びDybendal, T.等 (1989) Allergy, 44:401-411)。皮膚ブリック試験で評価した犬に対するアレルギーの罹患率は、約15%である (Haahtela, T.等、(1981) Allergy, 36:251-256及びGroot, H. 等、(1991) J.Allergy Clin.Immunol., 87:1056-1065)。ある研究に

において、犬アレルゲンに対する感受性は、喘息の子供の40%において、彼らの家庭で犬をペットとして飼っていないのに検出された (Vanto, T. 及びKoivikko, A., (1983) Acta Paediatr Scand., 72:571-575)。

犬の鱗屑の抽出物の投与による犬アレルギーの患者の治療は、猫の鱗屑の抽出物を用いる猫アレルギー患者の治療程効果があるとは判明していない (Hedlin, G. 等、(1991) J.Allergy Clin Immunol., 87:955-964)。増大する投与量のアレルゲンの注射を含む如何なる脱感作計画を用いても、治療中の潜在的アナフィラキシーの欠点があり、又、臨床症状の有意の低減を生じるのに十分な寛容を確立するには数年間にわたる治療を継続する必要があるとあり得る。

犬の毛及び鱗屑の抽出物は、多くのアレルゲン性蛋白質を含む複雑な混合物である (Loewenstein, H等、(1982) Proceedings 11th International Congress of Allergology and Clinical Immunology, London, 545-548; Uchlin, T等、(1984) Allergy, 39:125-133; Yman, L.等 (1984) Int.Arch.Allergy Appl.Immunol.U, 44:358-368; Spitzauer, S.等、(1993) Int.Arch.Allergy Immunol., 100:60-67)。犬の毛/鱗屑中に存在する2種のアレルゲンが、イムノアフィニティークロマトグラフィーを用いて精製された。犬由来の主要アレルゲンCanf I (IUISの基準による命名 (Marsh, D.G.等、(1988) Clin.Allergy, 18:201-209; オリジナル命名法によ

るAg13) が、2つのグループによって部分精製された (Schou, C.等、(1991) Cl

in. and Exp. Allergy, 21:321-328 及び de Groot 等、前出)。両グループは Canf I を部分精製し、C R I E 分析 (Ford A.W. 等、(1989) Clin. Exp. Allergy, 19:183-190) によりアレルゲンとして確立し、次いで、ウサギ又は B a l b / b マウスを免疫してこのアレルゲンに対するポリクローナル若しくはモノクローナル抗体をそれぞれ得た。犬アレルギー患者間の高頻度の陽性皮膚プリック試験を誘出したイムノアフィニティー精製した Canf I (分子量 ~ 25 k D、~ 18 k D の少量成分を伴う) は、R A S T (放射アレルゴソルベント試験) 分析において犬鱗屑抽出物に結合する I g E の 50 ~ 70 % を潤渇させることが出来た。de Groot 等は Canf I の如何なるアミノ酸配列の決定も試みなかったが、Schou 等は、彼らのイムノアフィニティー精製した Canf I のアミノ末端がブロックされていることを見出した。それ故に、現在、Canf I のアミノ酸配列は、公開されたものはない。

犬抽出物中の第2の(少量)アレルゲンの存在は、幾つかのグループにより、犬鱗屑/毛抽出物に対する I g E 抗体の結合により検出された (de Groot 等、Schou, C. 等、前出 及び Spitzauer 等、(1993) Int. Arch. Allergy Immunol., 100:60-67)。少量アレルゲンの分子量は、18 k D (Schou 等、前出)、19 k D (Spitzauer 等、前出) 及び 27 k d (de Groot 等、前

出) と報告された。しかしながら、これらの結果を相関させることは、1グループ (de Groot 等、前出) のみが Canf II と呼ばれる (最初は、Dog2 アレルゲンと命名された) アレルゲンをアフィニティー精製したので困難である。Canf II は、Canf I と類似の方法にて犬鱗屑抽出物から、抽出物中に存在する第2アレルゲン (de Groot 等、前出) に対して生成されたモノクローナル抗体を用いて精製された。このグループにより ~ 27 k D として報告された Canf II の分子量は、後に ~ 24 k D に変更された (Aalberse, R.C. 私信)。精製 Canf II アレルゲンは、犬アレルギー患者の 66 % としか反応しないことが見出された。R A S T 分析において、Canf II アレルゲンは、犬鱗屑抽出物に対する I g E の 23 % と競争することが出来た。この Canf II のアミノ酸配列は、以前には、決定されていない。

犬鱗屑アレルギーに対する感受性を有する多くの患者は、現在、少量の犬鱗屑抽出物を徐々に投与量を増加させる投与によって治療されている。これらの抽出物の利用は、治療中の潜在的アナフィラキシー並びに十分な寛容及び臨床症状の有意の軽減を確立するのにしばしば数年間にわたる治療継続の必要があることを含む多くの欠点を有する。少なくともこれらのCanf I及びCanf II等の主要犬鱗屑アレルギーの組成物の代用となる能力は、これらの欠点の幾つかを克服するであろう。従って、診断若しくは治療用試薬としての利用のための量で供給し

得る純粋なアレルギー源及び犬鱗屑抽出物と関係する欠点を克服する治療法は、大いに望ましい。

#### 発明の要約

この発明は、*Canis familiaris*種の蛋白質アレルギーCanf I若しくはCanf IIの少なくとも1つの生物学的活性を有するペプチドをコードする単離された核酸を提供する。好適核酸は図5 (SEQ ID NO:1) (Canf I) 及び図18 (SEQ ID NO:67) (Canf II) に示した核酸配列を有するcDNAである。この発明は又、かかるcDNA (SEQ ID NO:1及びSEQ ID NO:67) の全部又は一部によりコードされ且つCanf I若しくはCanf IIの少なくとも1つの生物学的活性を有するペプチドにも関係する。高緊縮条件 (例えば、 $T_m$ より低い20～27℃及び1M NaClと同等) 下で図5 (SEQ ID NO:1) 又は図18 (SEQ ID NO:67) に示した核酸配列を有し且つ図5 (SEQ ID NO:2) (Canf I) 又は図18 (SEQ ID NO:68) (Canf II) のアミノ酸配列の全部若しくは一部を含むペプチドをコードする核酸にハイブリダイズする単離した核酸をも企図している。Canf I若しくはCanf IIの活性を有し且つ図5 (SEQ ID NO:2) (Canf I) 若しくは図18 (SEQ ID NO:68) (Canf II) に示した配列と少なくとも50%の相同性を有するペプチドをコードする核酸をも叙述する。この発明の核酸の組換え発現により産生されたCanf I若しくはCanf II活

性を有するペプチド及び化学合成により製造したCanf I若しくはCanf II活性を有するペプチドも又この発明で叙述する。好適ペプチドは、T細胞刺激を含むT

細胞応答（例えば、T細胞増殖若しくはサイトカイン分泌により測定）又はT細胞不応答（即ち、ペプチド若しくはペプチドの複合体と抗原提示細胞のMHC分子との接触がT細胞に刺激シグナルに対する非応答性若しくは増殖不能を誘導する）を誘導する能力を有する。他の好適ペプチドは、T細胞応答を誘導する能力と別に若しくはそれに加えて、犬鱗屑アレルギー患者の犬鱗屑特異的IgEと結合する能力を有する。かかるペプチドは、患者における犬鱗屑に対する感受性を診断するのに有用である。更に他のペプチドは、T細胞応答を誘導する能力と別に若しくはそれに加えて、減少した若しくは無視し得る犬鱗屑アレルギー性IgEと結合する能力を有する。かかるペプチドは、特に、治療剤として有用である。

他の好適ペプチドは、図5（SEQ ID NO:2）（Canf I）又は図18（SEQ ID NO:68）（Canf II）に示したアミノ酸配列を含む。一具体例において、Canf I若しくはCanf II活性を有し且つ図5（SEQ ID NO:2）若しくは図18（SEQ ID NO:68）のアミノ酸配列の一部を含むペプチドは、少なくとも約8～39アミノ酸、好ましくは約10～20アミノ酸、最も好ましくは約10～16アミノ酸の長さである。

この発明の他の面は、Canf I若しくはCanf II活性を

有するペプチドと特異的に反応性である抗体を叙述する。Canf I若しくはCanf IIの活性を有するペプチドは薬剤投与に適した組成物において用いることが出来る。例えば、かかる組成物は、犬鱗屑抽出物に類似の方法で用いて患者における犬鱗屑に対するアレルギー反応を治療し又は予防することが出来る。この発明の核酸及びCanf I若しくはCanf IIの活性を有するペプチドを用いて犬鱗屑に対する患者の感受性を診断することも出来る。

#### 図面の簡単な説明

図1は、PCR増幅のMOPAC技術で用いる成熟Canf I蛋白質の9～15及び30～37残基に基づく縮重プライマー対を示す。Canf I蛋白質の17～24残基（Dogプローブ1）及び88～94残基（Dogプローブ2）に基づく2つの内部縮重オリゴヌクレオチドプローブを示している。

図2は、RACE PCRプロトコルでCanf I cDNAの3'部分を得るために用いるオリゴヌクレオチドを示す。縮重オリゴヌクレオチドプローブ(Dogプローブ4)も又示してある。

図3は、アンカードPCR技術でCanf I cDNAの5'末端を決定するために用いるプライマーを示す。

Canf蛋白質の9~17残基に基づく縮重オリゴヌクレオチドプローブ(Dogプローブ0)が示されている。

図4は、増幅したcDNAの両鎖からの成熟Canf I蛋白質の配列を得るために用いたPCR配列決定ストラテジーの図式表示である。

図5は、Canf IのcDNA配列及び演繹したアミノ酸配列である。

図6は、Canf I組換え蛋白質を細菌中で発現させるために用いたストラテジーの図式表示である。

図7は、Canf II組換え蛋白質を哺乳動物細胞内でpJ7L発現ベクターを用いて発現させるために用いたストラテジーの図式表示である。

図8は、His6レポーター基を組換えCanf I蛋白質のカルボキシ末端に蛋白質の精製を助成するために挿入するために用いたストラテジーの図式表示である。

図9は、3つの部分的3' Canf I cDNA配列(Canf I、2Canf I及び3Canf I)の整列を示す。(\*)は、この整列において完全に保存されている部分を示し、(.)は、よく保存されている部分を示す。(ー)は、整列させる目的で必要な場所に挿入した。

図10は、イン・ビトロで組換えCanf I(rCanf I)でプライムし、rCanf I及びCanf Iから誘導した種々のペプチドに対する応答についてポジティブ・インデックス(陽性応答した患者の%に平均刺激インデックスを乗じたもの)により分析した患者由来のT細胞系統の応答を描いたグラフ表示である。

図11は、細菌で発現させた組換えCanf Iに対する

一人の犬アレルギー患者由来のIgEの直接結合アッセイのグラフ表示である。

図12は、4つの蛋白質調製物の、犬アレルギー患者（901番）由来の血漿又は陰性対照患者（250番）由来の血漿をプローブとして用いたウエスタンブロット分析（レーン1：犬の毛の抽出物；レーン2：犬の唾液；レーン3：細菌で発現させた組換えCanf I；及びレーン4：哺乳動物細胞培養システムにて発現させた組換えCanf I）を示す。

図13は、成熟Canf IIの部分アミノ酸配列に基づくプライマーのデザイン及びCanf IIについての配列決定ストラテジーを示す。（ ）は、決定されなかった残基を示す。

図14は、Canf II cDNAをクローン化するために用いたストラテジーの図式表示である。

図15は、天然のCanf IIのアミノ酸配列の一部（影を付けてある）をコードする配列に隣接するCanf II cDNAの5'（A）及び3'（B）部分をクローン化するために用いたストラテジーの図式表示である。

図16は、Canf II cDNAのクローニングにおいて用いたプライマーのヌクレオチド配列である。

図17は、Canf II cDNAクローン1a、1c及び1jのヌクレオチド配列を決定するために用いたシーケンスストラテジーを示す。この図には、cDNAクローン1a（793bp）、1c（791bp）及び1j

（774bp）の挿入を描いてある。斜線を付けたバーは、コード配列を表している。三角形は、開始メチオニンコドン（ATG）の位置；成熟蛋白質のN末端アミノ酸残基を特定するコドン（START）；停止コドン（STOP）の位置；及びポリアダニル化シグナル（As）の位置を示している。矢印は、配列決定反応の範囲及び方向を示している。

図18は、Canf IIのcDNA配列及び演繹したアミノ酸配列（クローン1cより）である。

図19は、クローン1cのcDNA配列及びN末端の蛋白質配列決定により決定した天然Canf IIの一部に基づくCanf IIの演繹したアミノ酸配列の比較である。シグナルペプチドのアミノ酸残基は、-19~-1に番号付けしてある。

図20は、種々の犬組織のmRNAのノーザン分析を示す。犬の舌の上皮組織、耳下唾液腺、皮膚、大顎腺及び顎下腺、肝臓及び脾臓由来の全細胞RNA（25mg）を、Canf II cDNAをプローブとして用いるノーザン分析にかけた。RNAマーカーの位置をキロベース（kb）で示してある。

図21は、Canf IIのアミノ酸配列と相同な蛋白質MUP6マウス及びラットA2Uとの比較である。この整列は、Gene Worksプログラムを用いて作成した。シグナル配列2は下線を引いてある。3つの蛋白質すべてで同一のアミノ酸残基はボックスで囲んである。

図22A～Cは、天然のCanf II及び組換えCanf IIに結合するヒトIgEの直接結合アッセイのグラフ表示である。

図23は、Canf IIの部分若しくは全長をコードするcDNAクローン1a、1c及び1jの間のヌクレオチドコンセンサス配列である。

図24は、組換えCanf I（rCanf I）を用いてイン・ビトロでプライムし、rCanf I及びCanf Iから誘導した種々のペプチドに対する応答について刺激インデックスにより分析した12人の患者に由来するT細胞系統の応答を描いたグラフ表示である。バックグラウンドの2倍以上の刺激インデックスを「陽性」と考える。

図25は、組換えCanf I（rCanf I）を用いてイン・ビトロでプライムし、rCanf I及びCanf Iから誘導した種々のペプチドに対する応答についてこれらのペプチドに対する陽性応答を有する患者群について平均刺激インデックスにより分析した12人の患者に由来するT細胞系統の応答を描いたグラフ表示である。

#### 発明の詳細な説明

この発明は、*Canis familiaris*種のアレルゲンCanf I若しくはCanf IIの少なくとも1つの生物学的活性を有するペプチドをコードする単離した核酸に関するものである。好ましくは、この核酸は、図5（SEQ ID NO:1）（Canf I）若しくは図18（SEQ ID NO:67）（Canf II）

に示したヌクレオチド配列を含むcDNAである。



図5に示したcDNA (SEQ ID NO:1) は、塩基1~78によりコードされる26アミノ酸のリーダー配列を含むCanf Iペプチドをコードしている。このリーダー配列は、塩基79~525によりコードされる成熟Canf I蛋白質中には見出されない。このcDNAに基づくCanf Iの演繹されたアミノ酸配列も又図5に示してある (SEQ ID NO:2)。このcDNAは、予想分子量19.3 kDa、pI 5.53及び単一の潜在的N結合グリコシル化部位を有する成熟ペプチドをコードする。Canf IをコードするcDNAを含む発現ベクターでトランスフェクトした大腸菌の培養物をブダベスト条約の下でAmerican Type Culture Collectionに1992年12月22日に寄託し、受託番号69167を受けた。

図18に示したcDNA (SEQ ID NO:67) は、塩基195~251によりコードされる19アミノ酸のリーダー配列を含むCanf IIペプチドをコードする。このリーダー配列は、塩基252~734によりコードされる成熟Canf II蛋白質中には見出されない。このcDNAに基づいて演繹したCanf IIのアミノ酸配列を図18に示す (SEQ ID NO:68)。このcDNAは、予想分子量18.229 kDa、成熟組換えCanf II蛋白質についてはpI 4.54、全長の(シグナル配列を含む)組換えCanf II蛋白質についてはpI 4.44及び単一の潜在的N結合グリコシル化部位を有するCanf IIペプチド

をコードする。N結合グリコシル化はこのペプチドの分子量を増大させ及び成熟蛋白質のpIを変化させ得る。Canf IIをコードするcDNAを含む発現ベクターでトランスフェクトした大腸菌の培養物をブダベスト条約の下でAmerican Type Culture Collectionに1993年12月29日に寄託し、受託番号XXXXを受けた。

従って、この発明の1つの面は、Canf I若しくはCanf IIをコードするヌクレオチド配列、Canf I若しくはCanf IIの少なくとも1つの生物学的活性を有するペプチドをコードするその断片、及び/又はかかる核酸の同等物を含む単離した核酸に係る。この核酸という用語は、ここで用いる場合、かかる断片及び同等物を含むことを意図する。この同等物という用語は、機能的に同等のCanf I若しくはCanf II蛋白質又はCanf I若しくはCanf IIの活性を有する機能的に同等な

ペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むことを意図する。ここに規定するように、Canf I若しくはCanf IIの活性を有するペプチドは、Canf I若しくはCanf IIアレルゲンの少なくとも1つの生物学的活性を有する。同等なヌクレオチド配列は、1つ以上のヌクレオチドの置換、付加又は欠失により異なる配列例えば対立遺伝子変異物を含み、又、遺伝コードの縮重のために図5 (SEQ ID NO:1) 若しくは図18 (SEQ ID NO:67) に示したCanf I若しくはCanf IIをコードするヌクレオチド配列と異なる配列をも含む。同等物は又、緊縮条件（即ち、融解温度

( $T_m$ ) より低い約20～27℃に等しく且つ約1Mの塩)の下で、図5 (SEQ ID NO:1) に示したCanf I若しくは図18 (SEQ ID NO:67) に示したCanf IIのヌクレオチド配列にハイブリダイズするヌクレオチド配列をも含む。

Canf I若しくはCanf IIの活性を有するとしてここで言及するペプチドは、図5若しくは図18に示したCanf I (SEQ ID NO:2) 若しくはCanf II (SEQ ID NO:68) のアミノ酸配列の全部若しくは一部に対応するアミノ酸配列を有するペプチドとしてここに定義する（該ペプチドは、Canf I若しくはCanf IIの少なくとも1つの生物学的活性を有する）。例えば、Canf I若しくはCanf IIの活性を有するペプチドは、Canf I若しくはCanf II制限されたT細胞における応答例えば刺激（例えば、T細胞増殖若しくはサイトカイン分泌）を誘導する能力又はT細胞不応答を誘導する能力を有し得る。或は（若しくは更に）Canf I若しくはCanf IIの活性を有するペプチドは、犬鱗屑アレルギー患者の免疫グロブリンE (IgE) 抗体に結合する（認識される）能力を有し得る。IgEに結合するペプチドは、患者におけるCanf I若しくはCanf IIに対するアレルギー性感受性を検出する方法において有用である。IgEに結合しないか又は精製した天然のCanf I若しくはCanf II蛋白質がIgEに結合するよりも低い程度でIgEに結合するペプチドは、特に、治療剤として有用である。

一具体例において、核酸は、Canf I若しくはCanf IIの活性を有するペプチドをコードするcDNAである。好ましくは、この核酸は、図5 (SEQ ID NO:1)

及び図18 (SEQ ID NO:67) に示した Canf I 若しくは Canf II をコードするヌクレオチド配列の少なくとも一部を含む cDNA 分子である。図5 及び図18 の cDNA 分子の好適部分は、この分子のコード領域を含む。

他の具体例において、この発明の核酸は、Canf I 若しくは Canf II の活性を有し且つ図5 (SEQ ID NO:2) (Canf I) 若しくは図18 (SEQ ID NO:68) (Canf II) に示したアミノ酸配列を含むペプチドをコードする。好適核酸は、Canf I 若しくは Canf II 活性を有し且つ図5 (SEQ ID NO:1) (Canf I) 若しくは図18 (SEQ ID NO:67) (Canf II) に示した配列と少なくとも約50%の相同性、一層好適には少なくとも約60%の相同性、最も好適には少なくとも約70%の相同性を有するペプチドをコードする。Canf I 若しくは Canf II 活性を有し且つ図5 (SEQ ID NO:2) (Canf I) 若しくは図18 (SEQ ID NO:68) (Canf II) に示した配列と少なくとも約90%、一層好ましくは少なくとも約95%、最も好ましくは約98~99%の相同性を有するペプチドをコードする核酸も又この発明の範囲内にある。相同性とは、Canf I 若しくは Canf II の活性を有する2つのペプチド間又は2つの核酸分子間の配列類似性のことをいう。相同性は、比較の目的で整列させた各配列中

の位置を比較することによって決定することが出来る。比較した配列中の位置が同じ塩基若しくはアミノ酸で占められている場合には、これらの分子はその位置で相同である。配列間の相同性の程度は、これらの配列で共有されるマッチング数即ち相同な位置の関数である。

この発明の他の面は、図5 (SEQ ID NO:2) (Canf I) 若しくは図18 (SEQ ID NO:68) (Canf II) に示したアミノ酸配列の全部若しくは一部を有するペプチドをコードする核酸と高若しくは低緊縮条件下でハイブリダイズする核酸を提供する。DNA ハイブリダイゼーションを促進する適当な緊縮条件例えば  $6.0 \times$  塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム (SSC) (約45℃) とその後の  $2.0 \times$  SSC (50℃) での洗浄は、当業者に公知であり、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6.中に見出すことが出来る。例えば、洗浄工程における塩濃度は、約  $2.0 \times$  SSC (50

℃)の低緊縮から約 $0.2 \times SSC$ (50℃)の高緊縮までから選択することが出来る。更に、洗浄工程における温度は、約22℃の室温の低緊縮条件から約65℃の高緊縮条件まで増大させることが出来る。

ここに記載のようなCanf I若しくはCanf IIの活性を有するペプチド及び遺伝コードの縮重のために図5 (SEQ ID NO:1)及び図18 (SEQ ID NO:67)に示したヌクレオチド配列と異なる配列を有するペプチドをコー

ドする単離した核酸も又この発明の範囲内にある。かかる核酸は、機能的に同等のペプチド(即ち、Canf I若しくはCanf IIの活性を有するペプチド)であるが、遺伝コードの縮重のために図5及び図18の配列とは異なる配列のペプチドをコードしている。例えば、多くのアミノ酸は、1つより多くのトリプレットにより指定される。同じアミノ酸を特定するコドン即ちシノニム(例えば、CAUとCACはヒスチジンに対するシノニムである)は、Canf I若しくはCanf II蛋白質のアミノ酸配列に影響を与えない「サイレント」突然変異を生じ得る。しかしながら、Canf I若しくはCanf IIのアミノ酸配列の変化へ導くDNA配列多形が犬鱗屑集団内に存在することが予想される。当業者は、Canf I若しくはCanf IIの活性を有するペプチドをコードする核酸の1つ以上のヌクレオチドにおけるこれらの変化(ヌクレオチドの約3~4%まで)が自然の対立遺伝子変化のために個々のペットの犬の間に存在し得ることを認めるであろう。任意の及びすべてのかかるヌクレオチド変化並びにその結果のアミノ酸多形は、この発明の範囲内にある。更に、1つ以上のCanf I若しくはCanf IIのイソ型又は関連する交差反応ファミリーメンバーがある。かかるイソ型又はファミリーメンバーを、Canf I若しくはCanf IIと機能的及びアミノ酸配列において関連するが、異なる遺伝子座の遺伝子によりコードされる蛋白質として規定する。

Canf I若しくはCanf IIをコードする核酸の断片も又この発明の範囲内にある。ここで用いる場合、Canf I若しくはCanf IIをコードする核酸の断片とは、Canf I若しくはCanf II蛋白質の完全なアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列より少ないヌクレオチドを有するヌクレオチド配列及びここで規定するようなCa

Canf I若しくはCanf IIの活性を有するペプチド（即ち、Canf I若しくはCanf IIアレルゲンの少なくとも1つの生物学的活性を有するペプチド）をコードするヌクレオチド配列のことをいう。

好適核酸断片は、少なくとも約10アミノ酸残基長の、好ましくは約10～20アミノ酸残基長の、一層好ましくは約12～16アミノ酸残基長のペプチドをコードする。少なくとも約30アミノ酸残基長の、少なくとも約40アミノ酸残基長の、少なくとも約60アミノ酸残基長の、少なくとも約80アミノ酸残基長の、少なくとも約100アミノ酸残基長の及び少なくとも約140残基長以上のCanf I活性を有するペプチドをコードする核酸断片も又、この発明の範囲内にある。少なくとも約30アミノ酸残基長の、少なくとも約40アミノ酸残基長の、少なくとも約60アミノ酸残基長の、少なくとも約80アミノ酸残基長の、少なくとも約100アミノ酸残基長の、少なくとも約140残基長の及び少なくとも約160アミノ酸残基長以上のCanf II活性を有するペプチドをコードする核酸断片も又、この発明の範囲内に

ある。

この発明の範囲内の核酸断片は、Canf I若しくはCanf II又はCanf I若しくはCanf IIと交差反応性のアレルゲンを検出するスクリーニングプロトコールで用いるために、高若しくは低緊縮条件下で他の動物種由来の核酸とハイブリダイズすることの出来るものを含む。一般に、Canf I若しくはCanf IIの活性を有するペプチドをコードする核酸を、成熟蛋白質をコードする塩基から選択するが、幾つかの例では、この発明の核酸のリーダー配列部分からのペプチドの全部若しくは一部を選択することが望ましい。この発明の範囲内の核酸は又、Canf I若しくはCanf IIの活性を有する組換えペプチドの分子クローニング、発現若しくは精製に有用な、リンカー配列、修飾制限エンドヌクレアーゼ部位及び他の配列をも含んでよい。

Canf I若しくはCanf IIの活性を有するペプチドをコードする核酸は、ペットの犬 *Canis familiaris* の唾液腺その他の器官に存在する mRNA から得ることが出来る。*Canis familiaris* のゲノム DNA から Canf I若しくはCanf IIをコード

する核酸を得ることも又可能である。例えば、Canf I若しくはCanf IIをコードする遺伝子を、cDNA若しくはゲノムライブラリーの何れかから、ここに記載のプロトコールに従ってクローン化することが出来る。Canf I若しくはCanf IIをコードするcDNAは、*Canis familiaris*から全mRNAを単離

することにより得ることが出来る。次いで、二本鎖cDNAを全mRNAから調製することが出来る。続いて、これらのcDNAを、公知の幾つかの技術の内の任意の1つを用いて、適当なプラスミッド若しくはバクテリオファージベクターに挿入することが出来る。Canf I若しくはCanf IIをコードする遺伝子は又、この発明により提供されるヌクレオチド配列情報によって、確立されたポリメラーゼ連鎖反応技術を用いてクローン化することも出来る。この発明の核酸は、DNAであってもRNAであってもよい。好適核酸は、図5 (SEQ ID NO:1) (Canf I) 若しくは図18 (SEQ ID NO:67) (Canf II) に描かれた配列を有するCanf I若しくはCanf IIをコードするcDNAである。

この発明は又、Canf I若しくはCanf IIの活性を有するペプチドをコードする核酸を含む発現ベクター（少なくとも1つの制御配列に操作可能に結合したもの）をも提供する。操作可能に結合したとは、ヌクレオチド配列が制御配列にそのヌクレオチド配列の発現を可能とするような仕方で結合することを意味する。制御配列は、技術的に認識され（art-recognized）且つCanf I若しくはCanf IIの活性を有するペプチドの発現を指示するために選択される。従って、この制御配列という用語は、プロモーター、エンハンサー及び他の発現制御要素を含む。かかる制御配列は、Goeddel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic

Press, カリフォルニア, San Diego (1990) に記載されている。発現ベクターのデザインが、トランスフォームすべき宿主細胞の選択及び／又は発現させたい蛋白質の型等の因子に依存し得ることは理解されるべきである。一具体例において、発現ベクターは、Canf I若しくはCanf IIの活性を有するペプチドをコードするDNAを含む。かかる発現ベクターを用いて細胞をトランスフェクトし、それにより

、蛋白質若しくはペプチド（ここに記載のような核酸によりコードされる融合蛋白質若しくはペプチドを含む）を産生することが出来る。

この発明は、更に、Canf I若しくはCanf IIの活性を有するペプチドを発現するようにトランスフェクトされた宿主細胞に関係する。この宿主細胞は、任意の原核細胞又は真核細胞であってよい。例えば、Canf I若しくはCanf IIの活性を有するペプチドは、大腸菌等の細菌細胞、昆虫細胞（バキュロウイルス）、酵母、又はチャイニーズハムスター巣細胞（CHO）等の哺乳動物細胞において発現させることが出来る。他の適当な宿主細胞は、Goeddel, (1990)（前出）中に見出され又は当業者に公知である。

真核細胞例えば哺乳動物、酵母又は昆虫細胞における発現は、組換え蛋白質の部分的若しくは完全なグリコシル化及び／又は関連する鎖間若しくは鎖内ジスルフィド結合の形成へと導き得る。酵母*S.cerevisiae*中での発現のためのベクターの例は、pYepSec1 (Baldari等 (1987)

Embo J.,6:229-234), pMFa (Kurjan及びHerskowitz, (1982) Cell,30:933-943), pJRY88 (Schultz等 (1987) Gene,54:113-123) 及びpYES2 (カリフォルニア、San Diego在Invitrogen Corporation) を含む。培養昆虫細胞での蛋白質の発現用の入手し得るバキュロウイルスベクター（SF9細胞）は、pAcシリーズ (Smith等、(1983) Mol.Cell Biol.,3:2156-2165) 及びpVLシリーズ (Lucklow,V.A.及びSummers,M.D., (1989) Virology,170:31-39) を含む。一般に、COS細胞 (Gluzman,Y., (1981) Cell,23:175-182) は、哺乳動物細胞における一過性増幅／発現のためにpCDM8 (Aruffo,A. 及びSeed,B., (1987) Proc.Natl. Acad.Sci.USA,84:8573-8577) 等のベクターと共に用いるが、他方、CHO (dhfr-チャイニーズハムスター卵巣) 細胞は、哺乳動物細胞における安定な増幅／発現のためにpMT2PC (Kaufman等、(1987) EMBO J.,6:187-195) 等のベクターと共に用いる。ベクターDNAは、従来技術例えばリン酸カルシウム若しくは塩化カルシウム共沈殿、DEAE-デキストラン媒介のトランスフェクション、又は電気穿孔法によって哺乳動物細胞に導入することが出来る。宿主細胞をトランスフォームするための適当な方法は、Sambrook等 (Molecular Cloning:A Labo

ratory Manual, 第二版、Cold Spring Harbor Laboratory press (1989) ) 及びその他の実験室用テキスト中に見出すことが出来る。

原核生物中での発現は、最もしばしば大腸菌において誘導可能な融合若しくは非融合発現ベクターの何れかを用いて行なわれる。融合ベクターは、通常、幾つかのNH<sub>2</sub>末端アミノ酸を発現される標的遺伝子に加える。これらのNH<sub>2</sub>末端アミノ酸は、しばしば、レポーター基として言及される。かかるレポーター基は、通常、1) 標的組換え蛋白質の溶解度を増大させ、及び2) アフィニティー精製におけるリガンドとして作用することにより標的組換え蛋白質の精製を助けるという2つの目的を果たす。しばしば、融合発現ベクターにおいては、融合蛋白質の精製に続いて標的組換え蛋白質をレポーター基から分離することを可能にするために、蛋白質分解の開裂部位がレポーター基と標的組換え蛋白質との接合部に導入される。かかる酵素及びそれらの同系の認識配列は、Xa因子、トロンピン及びエンテロキナーゼを含む。典型的な融合発現ベクターは、pGEX (オーストラリア、Melbourne在、Amrad Corp)、pMAL (マサチューセッツ、Beverly在、New England Biolabs) 及びpRIT5 (ニューハンプシャー、Piscataway在、Pharmacia) を含み、これらは、それぞれ、グルタチオンS-トランスフェラーゼ、マルトース結合蛋白質又は蛋白質Aを標的組換え蛋白質と融合させる。

誘導可能な非融合発現ベクターは、pTrc (Amann等 (1988) Gene, 69:301-315) 及びpET11d (Studier等、Gene Expression Technology: Methods in

Enzymology, 185, Academic Press, カリフォルニア、San Diego在 (1990) 60-89)。標的遺伝子発現はpTrcではハイブリッドtrp-lac融合プロモーターからの宿主RNAポリメラーゼによる転写に依存しているが、pET11d中に挿入された標的遺伝子の発現は、同時発現されるウイルス性RNAポリメラーゼ (T7 gnl) により媒介されるT7 gnl0-lac0融合プロモーターからの転写に依存している。このウイルス性ポリメラーゼは、宿主株BL21 (DE3) 若しくはHMS174 (DE3) により、lacUV5プロモーターの転写制御下でT7 gnlを有する常在性λプロファージから供給される。



大腸菌における組換え Canf I 若しくは Canf II 発現を最大にするための1つの戦略は、その蛋白質を組換え蛋白質を蛋白質分解により開裂させる能力を減じた宿主細菌中で発現させることである (Gottesman, S., Gene Expression Technology: Methods in Enzymology, 185, Academic Press, カリフォルニア, San Diego 在 (1990) 119-128)。他の戦略は、発現ベクターに挿入されるべき Canf I 若しくは Canf II 蛋白質をコードする核酸を、各アミノ酸に対する個々のコドンが高度に発現される大腸菌蛋白質において優先的に用いられているものとなるように変えることであろう (Wada等、(1992) Nuc. Acids Res., 20:2111-2118)。この発明の核酸のかかる改変は、標準的DNA合成技術によって行なうことが出

来る。

この発明の核酸は、標準的技術を用いて化学的に合成することも出来る。ペプチド合成と同様に市販のDNAシンセサイザーにて完全自動化された固相合成を含むポリデオキシヌクレオチドを化学的に合成する種々の方法が知られている (例えば、Itakura等、米国特許第4, 598, 049号; Caruthers等、米国特許第4, 458, 066号; 及びItakura、米国特許第4, 401, 796号及び4, 373, 071号を参照されたい。これらを参考として本明細書中に援用する)。

本発明は、更に、Canf I 若しくは Canf II の活性を有するペプチドを生成する方法に関係する。例えば、Canf I 若しくは Canf II の活性を有するペプチドをコードするヌクレオチド配列の発現に向けられた核酸ベクターでトランスフェクトした宿主細胞を適当な条件下で培養してそのペプチドの発現を起こすことが出来る。このペプチドは、Canf I 若しくは Canf II の活性を有するペプチドを含む細胞及び培地の混合物から分泌され及び単離することが出来る。或は、このペプチドが細胞質に保持されるならば、細胞を採取して溶解させ、その蛋白質を単離することが出来る。細胞培養物は、宿主細胞、培地及び他の副生物を含んでいる。細胞培養に適した培地は、当業者に周知である。Canf I 若しくは Canf II の活性を有するペプチドは、細胞培養培地、宿主細胞又はその両者から、当業者に公知

の蛋白質精製のための技術を用い

て単離することが出来る。該技術は、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、限外濾過、電気泳動、及びCanf I若しくはCanf IIの活性を有するペプチドに対して特異的な抗体を用いるイムノアフィニティー精製を含む。

この発明の他の面は、Canf I若しくはCanf IIの活性を有する単離されたペプチドに関係する。Canf I若しくはCanf IIの活性を有するペプチドは、Canf I若しくはCanf IIアレルゲンの少なくとも1つの生物学的活性を有する。例えば、Canf I若しくはCanf IIの活性を有するペプチドは、Canf I若しくはCanf II特異的なT細胞における応答例えば刺激（T細胞増殖又はサイトカイン分泌）を誘導し或はT細胞不応答を誘導する能力を有し得る。一具体例において、Canf I若しくはCanf IIの活性を有するペプチドは、例えばT細胞増殖又はサイトカイン分泌により証明されるように、T細胞を刺激する。他の具体例において、Canf I若しくはCanf II活性を有するペプチドは、T細胞がCanf I若しくはCanf IIペプチドにさらされた後での該ペプチドを用いるチャレンジに非応答性であるT細胞不応答を誘導する。更に他の具体例において、Canf I若しくはCanf II活性を有するペプチドは、精製した天然のCanf I若しくはCanf II蛋白質と比較して減じたIgE結合活性を有する。Canf I若しくはCanf IIの活性を有するペプチドは、  
図5（SEQ ID NO:2）（Canf I）若しくは図18（SEQ ID NO:68）

（Canf II）に描いたCanf I若しくはCanf II配列とはアミノ酸配列において異なっていてよいが、かかる差異は、天然のCanf I若しくはCanf II蛋白質と同じ若しくは類似の仕方で機能し或は天然のCanf I若しくはCanf II蛋白質と同じ若しくは類似の性質を有する修飾された蛋白質を生じる。これらの及び他の機能的に同等のペプチドを生成するためのCanf I若しくはCanf II蛋白質の種々の修飾を本明細書に詳述する。ペプチドという用語は、ここで用いる場合、ペプチド、蛋白質及びポリペプチドのことをいう。

ペプチドは、図5（SEQ ID NO:2）（Canf I）若しくは図18（SEQ ID NO:68）

)(Canf II)に示したCanf I若しくはCanf II蛋白質のアミノ酸配列の修飾例えば蛋白質の機能に直接関与しないアミノ酸残基の置換、付加若しくは欠失によって生成することが出来る。この発明のペプチドは、少なくとも約10アミノ酸残基長、好ましくは約10～20アミノ酸残基長、一層好ましくは約10～16アミノ酸残基長であってよい。Canf I若しくはCanf IIの活性を有するペプチド及び少なくとも約30アミノ酸残基長、少なくとも約40アミノ酸残基長、少なくとも約60アミノ酸残基長、少なくとも約80アミノ酸残基長、及び少なくとも約100アミノ酸残基長のペプチドも又、この発明の範囲内に含まれる。

この発明の他の具体例は、Canf I若しくはCanf IIの活性を有するペプチドの実質的に純粋な調製物を提供す

る。かかる調製物は、このペプチドが天然において、細胞中で若しくは細胞から分泌された際に伴っている蛋白質及びペプチド(即ち、他のイヌペプチド)を実質的に含まない。

単離したという用語は、ここで用いる場合、組換えDNA技術により生成された場合に細胞性物質若しくは培地を実質的に含まず、或は化学合成された場合には化学前駆体若しくは他の化学物質を実質的に含まない核酸又はペプチドのことをいう。かかる蛋白質若しくはペプチドは、すべての他の犬鱗屑蛋白質を含まないことでも特徴付けられる。従って、Canf I若しくはCanf IIの活性を有する単離したペプチドは、組換えにより又は合成により生成され、細胞性物質及び培養培地を実質的に含まず或は化学的前駆体若しくは他の化学物質を実質的に含まず、そして、すべての他の犬蛋白質を実質的に含まない。単離した核酸は、その核酸を得た生物において、自然にその核酸に隣接する配列(即ち、その核酸の5'及び3'末端に位置する配列)をも含まない。

Canf I若しくはCanf IIの活性を有するペプチドを、例えばかかるペプチドをコードするCanf I若しくはCanf IIの核酸の対応する断片から組換えにより生成したペプチドをスクリーニングすることによって得ることが出来る。更に、断片を、当業者に公知の技術例えば従来のMerrifield固相f-Moc若しくはt-Boc化学等を用いて化学合成することが出来る。例えば、Canf I若し

くはCanf II蛋白質は、断片の重複を有しないで所望の長さの断片に自由に分割することが出来、或は、好ましくは、所望の長さの重複する断片に分割することが出来る。これらの断片を生成し（組換え若しくは化学合成による）そして試験してCanf I若しくはCanf II活性（即ち、T細胞応答例えば刺激（増殖、サイトカイン分泌）、不応答を誘導し及び／又は減じたIgE結合活性を有する能力）を有するペプチドを同定することが出来る。

一具体例において、Canf I若しくはCanf IIの活性を有するペプチドを、そのペプチドのT細胞を刺激する能力又はT細胞不応答を誘導する能力によって同定することが出来る。例えばT細胞増殖若しくはサイトカイン分泌により測定して、T細胞を刺激するペプチドを、ここでは、少なくとも1つのT細胞エピトープを含むと規定する。T細胞エピトープは、アレルギーの臨床症状の原因である蛋白質アレルゲンに対する免疫応答の開始及び持続に関与するものと考えられる。これらのT細胞エピトープは、抗原提示細胞表面上の適当なHLA分子に結合し、それによりこのエピトープに対する関連T細胞レセプターを有するT細胞サブポピュレーションを刺激することによって、ヘルパーT細胞のレベルで初期事象の引き金を引くと考えられる。これらの事象は、T細胞増殖、リンホカイン分泌、局所的炎症反応、抗原／T細胞相互作用部位への追加の免疫細胞の補充、及び抗体産生

へと導くB細胞カスケードの活性化へと導く。これらの抗体の1つのイソ型であるIgEは、アレルギー症状の進展に基本的に重要であり、その産生はヘルパーT細胞のレベルで事象のカスケードの初期に分泌されたリンホカインの性質により影響を受ける。T細胞エピトープは基本的要素であり又はT細胞レセプターによる認識の最小単位であり、このエピトープは、レセプター認識に必須のアミノ酸を含んでいる。これらのT細胞エピトープのアミノ酸配列を真似たアミノ酸配列及び蛋白質アレルゲンに対するアレルギー応答を調節するアミノ酸配列は、この発明の範囲内にある。

ここに記載したようなCanf I若しくはCanf II活性を保持するペプチドをスク

リーニングすることは、幾つかの異なるアッセイの1つ以上を用いて達成することが出来る。例えば、Canf I若しくはCanf IIT細胞刺激活性は、イン・ビトロで、Canf I若しくはCanf II活性を有することが知られ若しくは疑われるペプチドを、T細胞培養中の適当なMHC分子を提供する抗原提示細胞と接触させることによってアッセイされる。Canf I若しくはCanf II活性を有するペプチドを適当なMHC分子と結合して、必要な同時刺激と共にT細胞に提供することは、増大したレベルのサイトカイン特にインターロイキン2及びインターロイキン4の産生を誘導するシグナルをT細胞に伝達する効果を有する。この培養上清を得て、インターロイキン2若しくは他の公知のサイトカインについてアッセイすることが出来る。例えば、インターロイキン2についての幾つかの従来のアッセイの任意のもの例えばProc.Natl.Acad.Sci.USA,86:1333(1989)に記載されたアッセイを用いることが出来、その直接関係のある部分を参考として本明細書中に援用する。インターフェロンの産生についてのアッセイのためのキットも又Genzyme Corporation (マサチューセッツ、Cambridge在)から入手可能である。

或は、T細胞増殖についての一般的アッセイは、トリチウム化チミジンの取り込みの測定を必要とする。T細胞の増殖は、培養細胞の複製DNAに取り込まれた<sup>3</sup>H

標識したチミジンの量を測定することによりイン・ビトロで測定することが出来る。それ故に、DNA合成の速度、従って、細胞分裂の速度を定量することが出来る。

一具体例において、Canf I若しくはCanf IIT細胞刺激活性を有するペプチド(即ち、少なくとも1つのT細胞エピトープを含むペプチド)を、蛋白質配列中のT細胞エピトープの存在を予想するアルゴリズム例えばHill等、Journal of Immunology,147:189-197(1991)により記載されたアルゴリズムを用いて同定することが出来る。Hill等のアルゴリズムは、MHCに結合しそうでありそれ故T細胞エピトープを含み得る配列中のあるパターンの存在により蛋白質中のT細胞エピトープの位置を予想する。Hill等のアルゴリズムに基づいて、2つの13アミノ酸ペプチド(実施例10で検討)が同定され、合成により生成された。かか

るペプチドを上記のようにT細胞活性について試験した（例えば、トリチウム化チミジンの細胞への取り込みの測定による）。特に実施例10において、ヒトT細胞刺激活性を、Canf Iに感受性の個人（即ち、Canf Iに対するIgE媒介の免疫応答を有する個人）から得たT細胞を、Canf Iから導いたペプチドと共に培養することにより試験し、このペプチドに対する応答におけるT細胞の増殖を例えばトリチウム化チミジンの細胞への取り込みを測定することにより測定した。T細胞によるペプチドに対する応答についての刺激インデックスを、ペプチドに対する応答における最大C

PMを対照CPMにより除したものとして計算した。バックグラウンドレベルの2倍以上の刺激インデックス（S. I.）を「陽性」と考えた。陽性結果は、試験した患者群について各ペプチドに対する平均刺激インデックスを計算するために用いた（図25を参照されたい）。この発明の好適ペプチドは、少なくとも1つのT細胞エピトープを含み、2.0以上の平均T細胞刺激インデックスを有する。試験した犬鱗屑アレルギー感受性患者の相当数において2.0以上の平均T細胞刺激インデックスを有するペプチドは、治療剤として有用であると考えられる。好適ペプチドは、少なくとも2.5、一層好ましくは少なくとも3.0、一層好ましくは少なくとも3.5、一層好ましくは少なくとも4.0、一層好ましくは少なくとも5.0、最も好ましくは少なくとも約6の平均T細胞刺激インデックスを有する。例えば、Canf I活性を有し、少なくとも5の平均T細胞刺激インデックスを有するペプチドは、図25に示したデータにより示されるように、Construct 1（SEQ ID NO:105）、Construct 2（SEQ ID NO:106）及びConstruct 3（SEQ ID NO:107）を含む。T細胞エピトープは、Canf IIから導かれるペプチドについても上記のように予想し、測定することが出来る。

更に、好適ペプチドは、少なくとも約60の、一層好ましくは約100の、一層好ましくは少なくとも約200の、最も好ましくは少なくとも約300のポジ

ティブインデックス（P. I.）を有する。ペプチドについてのポジティブ

ティーインデックスを、平均T細胞刺激インデックスに、犬鱗屑アレルゲンに感受性の個人の集団（例えば、好ましくは少なくとも12人の個人、一層好ましくは少なくとも30人の個人又はそれ以上）におけるかかるペプチドに対する少なくとも2.0のT細胞刺激インデックスを有する個人のパーセントを乗じることにより測定する。従って、ポジティブティーインデックスは、ペプチドに対するT細胞応答の強さ（S. I.）と犬鱗屑アレルゲンに感受性の個人の集団におけるペプチドに対するT細胞応答の頻度の両方を表す。図10において、バーは、ポジティブティーインデックス及びCanf Iから導いた種々のペプチドに対する少なくとも2.0のT細胞刺激インデックスを有する試験した個人のパーセントを表す。例えば、図25に示したように、ペプチドA0095は、試験した個人集団において、3.0の平均S. I. 及び43%の陽性応答を有し、その結果129のポジティブティーインデックスとなる。

例えば、微細マッピング技術により正確なT細胞エピトープを決定するために、Canf I若しくはCanf IIT細胞刺激活性を有しそれ故T細胞生物学技術により測定して少なくとも1つのT細胞エピトープを含むペプチドを、そのペプチドのアミノ若しくはカルボキシ末端のアミノ酸残基の付加又は欠失により修飾し、その修飾ペプ

チドに対するT細胞反応性の変化を測定する。この技術の後で、ペプチドを選択して、組換えにより又は合成により生成する。ペプチドを、そのペプチドに対するT細胞応答の強さ（即ち、刺激インデックス）、犬鱗屑アレルゲンに感受性の個人集団中のそのペプチドに対するT細胞応答の頻度、及びそのペプチドと他の犬鱗屑アレルゲンとの潜在的交差反応性を含む種々の因子に基づいて選択する。これらの選択したペプチドの物理的及び化学的特性を試験してこれらのペプチドが治療用組成物における使用に適しているか否か或はこれらのペプチドがここに記載のような修飾を必要とするか否かを決定する。次いで、これらの選択したペプチド又は選択した修飾ペプチドのヒトT細胞を刺激する能力（例えば、増殖、リンホカイン分泌を誘導する）をここに記載のようにして測定する。

他の具体例において、Canf I若しくはCanf II活性を有するペプチドを、T細胞

胞不応答を誘導する能力についてスクリーニングする。T細胞を刺激し（上記のアッセイの1つ以上により測定）、精製した天然のCanf I若しくはCanf II又はその一部の活性を阻害し若しくは完全にブロックすることが知られたペプチド、及び不応答の状態を誘導することが知られたペプチドの能力を、Canf I若しくはCanf II活性を有するペプチドにさらした後に、天然Canf I若しくはCanf II又はCanf I若しくはCanf II活性を有するペプチドを提供する抗原提示細胞

によるT細胞の刺激におけるその後の試みを用いて測定することが出来る。もしT細胞が、その後の活性化の試みに対してインターロイキン2合成及び／又はT細胞増殖により測定して非応答性であるならば、不応答性状態が誘導されている。本発明によるアッセイのための基礎として利用することの出来るアッセイ系については、例えば、Gimmi等、(1993) Proc.Natl.Acad.Sci USA,90:6586-6590; 及びSchwartz (1990) Science,248:1349-1356を参照されたい。

更に他の具体例において、Canf I若しくはCanf II活性を有するペプチドをIgE結合活性により同定する。治療目的のためには、この発明のペプチドは、好ましくは、犬鱗屑アレルギーに特異的なIgEに結合しないか又は対応する精製した天然の犬鱗屑アレルギーがかかるIgEに結合するよりも実質的に低い程度でかかるIgEに結合する。減じたIgE結合活性とは、精製した天然のCanf I若しくはCanf II蛋白質のそれより低いIgE結合活性のことをいう。もしCanf I若しくはCanf II活性を有するペプチドを診断試薬として用いるならば、そのペプチドは、天然のCanf I若しくはCanf IIアレルギーと比較して減じたIgE結合活性を有する必要はない。ペプチドのIgE結合活性を、例えば、以前に天然のCanf I若しくはCanf IIアレルギーにさらされた患者（例えば、アレルギー患者）から得た血清を用いて、例えば、酵素結合免疫ソルベントアッセイ（ELIS

A）により測定することが出来る。簡単に言えば、Canf I若しくはCanf II活性を有すると疑われるペプチドをマイクロ滴定プレートのウェル上にコートする。それらのウェルを洗浄しブロックした後に、Canf I若しくはCanf II活性を有する



疑いのあるペプチドにさらされたアレルギー患者の血漿からなる抗体溶液をそれらのウェル中でインキュベートする。血漿は、一般に、インキュベーション前にIgGが枯渇している。標識した第2抗体をこれらのウェルに加えてインキュベートする。次いで、IgE結合の量を定量し、精製した天然のCanf I若しくはCanf II蛋白質により結合されたIgEの量と比較する。或は、ペプチドのIgE結合活性をウエスタンブロット分析により測定することが出来る。例えば、Canf I若しくはCanf II活性を有すると疑われるペプチドをSDS-PAGEを用いてポリアクリルアミドゲル上で電気泳動する。次いで、このペプチドをニトロセルロースにトランスファーし、続いてアレルギー患者由来の血清と共にインキュベートする。標識した第2抗体と共にインキュベートした後に、結合したIgEの量を測定して定量する。

ペプチドのIgE結合活性を測定するために利用することの出来る他のアッセイは、競争ELISAアッセイである。簡単に言えば、IgE抗体プールを、直接ELISAにより天然のCanf I若しくはCanf IIと反応性のIgEを有することが示された犬鱗屑アレルギー患者由

来の血漿を合わせるにより生成する。このプールをELISA競争アッセイにおいて用いて天然のCanf I若しくはCanf II及びCanf I若しくはCanf II活性を有することが疑わしいペプチドのIgE結合を比較する。天然のCanf I若しくはCanf II蛋白質及びCanf I若しくはCanf II活性を有すると疑われるペプチドのIgE結合を測定して定量する。

もしCanf I若しくはCanf IIの活性を有するペプチドがIgEと結合し、治療剤として利用されるならば、かかる結合がマスト細胞若しくは好塩基球からのメディエーター（例えば、ヒスタミン）の放出を生じないのが好ましい。IgEと結合するペプチドがメディエーターの放出を生じるか否かを決定するために、例えばAmac, Inc.（メリーランド、Westbrook在）から得られる標準試薬及びプロトコールを用いてヒスタミン放出アッセイを行なうことが出来る。簡単に言えば、Canf I若しくはCanf II活性を有すると疑われるペプチドの緩衝溶液を等容量のアレルギー患者由来の全ヘパリン化血液と合わせる。混合及びインキュベシ

ヨンの後に、これらの細胞をペレット化し、上清をラジオイムノアッセイを用いて処理して分析し、放出されたヒスタミンの量を測定する。

治療剤として用いる Canf I 若しくは Canf II の活性を有するペプチドは、好ましくは、犬鱗屑アトピーの哺乳動物モデル例えば Tanimura 等、(1986) Microbiol.

Immunol., 30:883-896 又は米国特許第 4, 939, 239 号に開示されたマウスモデル或は Chiba 等、(1990) Int. Arch. Allergy Immunol., 93:83-88 に開示された霊長類モデル等にて試験する。Canf I 若しくは Canf II の活性を有するペプチドに結合する IgE に対する初期スクリーニングは、実験動物又はヒトの志願者におけるスクラッチ試験又は皮内試験により、或は上記のような、イン・ビトロ系例えば RAST、RAST 阻害、ELISA アッセイ、RIA (ラジオイムノアッセイ) 又はヒスタミン放出アッセイ等により行なうことが出来る。

Canf I 若しくは Canf II の活性を有するペプチドの構造を、溶解度を増し、治療若しくは予防効果又は安定性 (例えば、生体外貯蔵寿命及び生体内での蛋白質分解に対する抵抗性) を高める目的のために修飾することは可能である。かかる修飾ペプチドは、ここに規定するような Canf I 若しくは Canf II の活性を有するペプチドの機能的同等物と考えられる。修飾ペプチドは、アミノ酸の置換、欠失若しくは付加等によって、アミノ酸配列を変えて免疫原性を改変し及び／又はアレルギー性を減じ、或は同じ目的のために成分を追加して生成することが出来る。

例えば、Canf I 若しくは Canf II の活性を有するペプチドを修飾して、それが T 細胞不応答を誘導する能力及び、免疫原性形態で投与したときに強い増殖応答若しくは出来れば如何なる増殖応答を誘導する能力をも伴わず

に MHC 蛋白質と結合する能力を維持するようにすることが出来る。この例において、T 細胞レセプター機能にとって決定的な結合性残基を公知の技術 (例えば、各残基の置換及び T 細胞反応性の存在若しくは不存在の測定) を用いて決定することが出来る。T 細胞レセプターとの相互作用に必須であることが示されたそ

これらの残基を、必須のアミノ酸を他の好ましくは類似のアミノ酸残基で置換（保存的置換）することにより修飾することが出来、その存在は、T細胞反応性を増大させ、減少させるが排除せず、又は該反応性に影響を与えないことが示される。更に、T細胞レセプター相互作用に必須でないアミノ酸残基を、他のアミノ酸であってその取り込みがT細胞反応性を増大させ、減少させ得るが排除せず、又は該反応性に影響を与えないが関連MHCへの結合を排除しないアミノ酸で置換することにより修飾することが出来る。

更に、Canf I若しくはCanf IIの活性を有するペプチドを、MHC蛋白質複合体との相互作用に必須であることが示されたアミノ酸を他の好ましくは類似のアミノ酸残基で置換（保存的置換）するによって修飾することが出来、その存在は、T細胞活性を増大させ、減少させるが排除せず、又は該活性に影響を与えないことが示される。更に、MHC蛋白質複合体との相互作用に必須でないが、やはりMHC蛋白質複合体に結合するアミノ酸残基を、他のアミノ酸であってその取り込みがT細胞反応

性を増大させ、該反応性に影響せず又は該反応性を減少させ得るが排除しないアミノ酸により置換することにより修飾することが出来る。非必須アミノ酸に対する好適アミノ酸置換は、アラニン、グルタミン酸又はメチルアミノ酸での置換を含むが、これらに限定されない。

Canf I若しくはCanf IIの活性を有するペプチドの修飾の他の例は、ジスルフィド結合を介する2量体形成を最少化するためのシステイン残基の好ましくはアラニン、セリン、スレオニン、ロイシン又はグルタミン酸残基での置換である。更に、この発明の蛋白質の断片のアミノ酸側鎖を化学的に修飾することが出来る。他の修飾は、このペプチドの環化である。

安定性及び／又は反応性を増大させるために、Canf I若しくはCanf IIの活性を有するペプチドを修飾して、任意の天然の対立遺伝子変異から生じる蛋白質アレルゲンのアミノ酸配列における1つ以上の多形を取り込むことが出来る。更に、D-アミノ酸、非天然アミノ酸又は非アミノ酸アナログを置換し又は付加してこの発明の範囲内の修飾蛋白質を生成することが出来る。更に、Canf I若しくは

Canf IIの活性を有するペプチドを、A.Sehonと共同研究者（Wie等、前出）の方法によって、ポリエチレングリコール（PEG）を用いて修飾して、PEGと結合した蛋白質を生成することが出来る。更に、PEGを、その蛋白質の化学合成の間に加えることが出来る。Canf I若しくはCanf IIの活性を有するペプ

チドの他の修飾は、還元／アルキル化（Tarr, Methods of Protein Microcharacterization, J.E.Silver編、Humana Press, ニューヨーク、Clifton 在155-194（1986））；アクリル化（Tarr, 前出）；適当なキャリアーとの化学カップリング（Mishell及びShiigi編、Selected Methods in Cellular Immunology, WH Freeman, カリフォルニア、San Francisco（1980）, 米国特許第4,939,239号）；又は温和なホルマリン処理（Marsh,（1971）Int.Arch.of Allergy and Appl.Immunol., 41:199-215）を含む。

Canf I若しくはCanf IIの活性を有するペプチドの精製を容易にし及び潜在的に溶解度を増大させるために、アミノ酸融合部分をペプチド主鎖に加えることが出来る。例えば、固定化金属イオンアフィニティークロマトグラフィーによる精製のためにヘキサヒスチジンを蛋白質に加えることが出来る（Hochuli, E.等、（1988）Bio/Technology, 6:1321-1325）。更に 無関係の配列を含まないペプチドの単離を容易にするために、特異的なエンドプロテアーゼ開裂部位を融合部分とペプチドの配列の間に導入することが出来る。患者を上首尾にCanf I若しくはCanf II蛋白質又は関連アレルゲンに対して脱感作するために、蛋白質の溶解度を、官能基をその蛋白質に付加し又は疎水性領域を削除することにより増大させることは必要であり得る。

Canf I若しくはCanf II内のT細胞エピトープの適当

な抗原プロセッシングを潜在的に助成するために、標準的プロテアーゼ感受性部位を、それぞれ少なくとも1つのT細胞エピトープを含む領域の間に組換え若しくは合成法によって作成することが出来る。例えば、荷電アミノ酸対例えばKK又はRR等を、組換え体構築中に、蛋白質若しくは断片の内部領域間に導入することが出来る。その結果生成するペプチドは、カテプシン及び／又は他のトリプ

シン様酵素による開裂に対する感受性を付与され得る（該開裂は、1つ以上のT細胞エピトープを含む蛋白質の部分を生合成する）。更に、かかる荷電アミノ酸残基は、ペプチドの溶解度の増加を生じ得る。

Canf I若しくはCanf IIの活性を有するペプチドをコードする核酸の位置指定突然変異導入法を用いて、当業者に公知の方法により、そのペプチドの構造を修飾することが出来る。かかる方法は、他の方法の内、1つ以上の突然変異を有するオリゴヌクレオチドプライマー（Ho等、（1989）Gene,71:51-59）を使用するポリメラーゼ連鎖反応（PCR）又は突然変異遺伝子の全合成（Hostomsky,Z.等、（1989）Biochem.Biophys.Res.Comm,161:1056-1063）を含んで良い。組換え蛋白質発現を増大させるために、上記の方法を適用して、この発明のcDNA配列中に存在するコドン、組換え蛋白質が発現される宿主細胞により優先的に利用されるものに変えることが出来る（Wada等、前出）。

この発明の他の面は、Canf I若しくはCanf IIの活性

を有するペプチドと特異的に反応性の抗体に関係する。この発明の抗体を用いて、アレルゲン抽出物を標準化し又は天然の若しくは天然型のCanf I若しくはCanf IIを単離することが出来る。例えば、Canf I若しくはCanf IIのcDNA配列に基づいて、Canf I若しくはCanf IIの活性を有するペプチドを利用することにより、抗蛋白質/抗ペプチド抗血清又はモノクローナル抗体を、標準的方法を用いて作成することが出来る。哺乳動物例えばマウス、ハムスター又はウサギを、このペプチドの免疫原型（例えば、Canf I若しくはCanf II蛋白質又は抗体応答を誘出し得る抗原性断片）を用いて免疫化することが出来る。蛋白質又はペプチドに免疫原性を与えるための技術は、キャリアーへの結合その他の当業者に周知の技術を含む。Canf I若しくはCanf IIの活性を有するペプチドをアジュバントの存在下で投与することが出来る。免疫化の進行は、血漿若しくは血清中の抗体力価の検出により監視することが出来る。免疫原を抗原として用いる標準ELISA若しくは他のイムノアッセイを利用して抗体レベルを評価することが出来る。

免疫化の後に、抗Canf I若しくは抗Canf II抗血清を得ることが出来、所望であれば、ポリクローナル抗Canf I若しくは抗Canf II抗体をその血清から単離す

ることが出来る。モノクローナル抗体を生成するために、抗体産生細胞（リンパ球）を免疫化した動物から採取して、標準的体細胞融合手順により不滅化細胞例えばミエロー

マ細胞と融合させてハイブリドーマ細胞を生成する。かかる技術、例えばKohler及びMilstein, (1975) Nature, 256:495-497により最初に開発されたハイブリドーマ技術並びに他の技術例えばヒトB細胞ハイブリドーマ技術（Kozbar等、(1983) Immunology Today, 4:72）及びヒトモノクローナル抗体を生成するためのE B Vハイブリドーマ技術（Cole等、(1985) Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc. 77-96頁）は、当業者には周知である。ハイブリドーマ細胞を、Canf I若しくはCanf IIの活性を有するペプチドと特異的に反応する抗体の産生について免疫化学的にスクリーニングして、モノクローナル抗体を単離することが出来る。

抗体という用語は、ここで用いる場合、Canf I若しくはCanf IIの活性を有するペプチドと特異的に反応する抗体の断片をも含むものとする。抗体は、従来技術を用いて断片化することが出来、それらの断片を全抗体について上述したのと同様の方法において利用のためにスクリーニングすることが出来る。例えば、F(ab')<sub>2</sub>断片を、抗体をペプシンで処理することにより生成することが出来る。その結果生成したF(ab')<sub>2</sub>断片を処理してジスルフィド橋を還元してFab'断片を生成することが出来る。本発明の抗体は、更に、抗Canf I若しくは抗Canf II I蛋白質を有する複特異性のキメラ分子を含むものとする。

この発明の他の面は、Canf I若しくはCanf IIの活性

を有するペプチドと特異的に反応するT細胞クローン及び可溶性T細胞レセプターを提供する。モノクローナルT細胞集団（即ち、遺伝的に互いに同一であり、同一のT細胞レセプターを発現しているT細胞）を、Canf I若しくはCanf IIに感受性の個人から導出し、その後、イン・ビトロで、Canf I若しくはCanf II蛋白質又はCanf I若しくはCanf IIの活性を有するペプチドで、MHCマッチした抗原提示細胞の存在下で反復刺激することが出来る。その後、単一のCanf I若し

くは Canf II MHC 応答性細胞を限界希釈によりクローン化し、永久細胞系統を周期的イン・ビトロ再刺激により発達させて維持することが出来る。或は、Canf I 若しくは Canf II 特異的 T-T ハイブリドーマを、B 細胞ハイブリドーマ産生に類似した技術によって生成することが出来る。例えば、マウス等の動物を、Canf I 若しくは Canf II の活性を有するペプチドで免疫化し、次いで、T 細胞を精製して自律増殖性の T 細胞腫瘍細胞系統と融合する。その結果生成したハイブリドーマから、Canf I 若しくは Canf II の活性を有するペプチドに応答する細胞を選択してクローン化する。増殖中のモノクローナル T 細胞集団からの手順は、Cellular and Molecular Immunology (Abul K. Abbas 等編)、W.B. Saunders Company, シンシナティ、Philadelphia 在 (1991) 139 頁に記載されている。Canf I 若しくは Canf II の活性を有するペプチドと特異的に反応する可溶性 T 細胞レセプターを、Immunology:

A Synthesis (第二版), Edward S. Golub 等編、Sinauer Associates, Inc., マサチューセッツ、Sunderland 在 (1991) 366-269 に記載されたような T 細胞レセプターに対する抗体を用いる免疫沈降により得ることが出来る。

Canf I 若しくは Canf II の活性を有するペプチドと特異的に反応する T 細胞クローンを用いて、関連 T 細胞レセプターをコードする遺伝子を単離して分子的にクローン化することが出来る。更に、Canf I 若しくは Canf II の活性を有するペプチドと特異的に反応する可溶性 T 細胞レセプターを用いて、例えば Canf I 若しくは Canf II に感受性の個人に投与することにより、関連 T 細胞サブポピュレーションの抗原依存性活性化を邪魔し又は阻止することが出来る。かかる T 細胞レセプターと特異的に反応性の抗体を、ここに記載の技術によって生成することが出来る。かかる抗体を用いて、T 細胞と MHC により提供されるペプチドとの相互作用をブロックし又は邪魔することが出来る。

アレルギー患者を Canf I 若しくは Canf II の活性を有し且つ T 細胞刺激活性を有するペプチドにさらすことは、適当な T 細胞サブポピュレーションを応答性蛋白質アレルギーに対して不応答性 (例えば、このようにさらすことに対して免疫応答を刺激しない等) にする。更に、かかる投与は、天然の蛋白質アレルギー若

しくはその部分にさらすことに比較してリンホカイン分泌プロファイルを改変し得る（例えば、IL-4の減少及び／又は

IL-2の増加）。更に、T細胞刺激活性を有するCanf I若しくはCanf IIの活性を有するペプチドにさらすことは、通常はアレルゲンに対する応答に関与するT細胞サブポピュレーションに影響を与えて、これらのT細胞がアレルゲンにさらされた通常の部位から離れてこの蛋白質若しくはそれから導かれた断片の治療投与部位に向かうようにすることが出来る。このT細胞サブポピュレーションの再配分は、通常のアレルゲンにさらされた部位において通常の免疫応答を刺激する個人の免疫系の能力を改善し又は低減させてアレルギー症状を軽減させることが出来る。

Canf I若しくはCanf IIの活性を有するペプチドは、犬鱗屑アレルゲンに感受性の患者に投与した場合に、そのアレルゲンに対するその患者のB細胞応答、T細胞応答、又はB細胞及びT細胞応答の両者を改変することが出来る。ここで用いる場合、患者の犬鱗屑アレルゲンに対するアレルギー応答の改変とは、標準的臨床手順（Varney等、（1990）British Medical Journal, 302:265-269を参照されたい）により測定して、アレルゲンに対する不応答又は症状の軽減（犬鱗屑で誘導された喘息症状の軽減を含む）として定義する。ここで言及する場合、症状の軽減とは、この発明のペプチドを用いる治療養生法の後における、アレルゲンに対する患者の如何なるアレルギー症状の軽減をも含む。この症状の軽減は、主観的に（例えば、患者がそのアレルゲンにさらされた

際に一層快適に感じる等）又は臨床的に（例えば、標準皮膚試験により）測定することが出来る。

本発明のペプチド又は抗体を、Canf I若しくはCanf IIに対する感受性を検出し及び診断するために利用することも出来る。例えば、これは、感受性を評価すべき患者から得た血液若しくは血液製剤をCanf I若しくはCanf IIの活性を有するペプチドと、その血液中の成分（例えば、抗体、T細胞、B細胞）がこの（これらの）ペプチドと結合するのに適した条件下で合わせて、かかる結合が起きる



程度を測定することによってなし得る。これらの本発明のペプチド又は抗体を利用することの出来るアレルギー疾患に対する他の診断方法は、ラジオアレルゴソルベント試験 (R A S T)、ペーパーラジオイムノソルベント試験 (P R I S T)、酵素結合イムノソルベントアッセイ (E L I S A)、ラジオイムノアッセイ (R I A)、イムノラジオメトリックアッセイ (I R M A)、ルミネッセンスイムノアッセイ (L I A)、ヒスタミン放出アッセイ及び I g E イムノブロットを含む。

本発明は、更に、Canf I若しくはCanf IIに対する患者の感受性を検出し及び治療する方法を提供する。患者におけるCanf I若しくはCanf IIに特異的な I g E の存在及びCanf I若しくはCanf IIの T 細胞エピトープに対する患者の T 細胞の応答能力を、Canf I若しくはCanf IIの活性を有するペプチド又はCanf I若しくはCanf

IIの活性を有する修飾型ペプチド（それぞれ、このアレルゲンに特異的な I g E に結合する）を用いて、患者に即時型過敏症試験及び／又は遅延型過敏症試験（Immunology (1985) Roitt, I.M., Brostoff, J., Male, D.K. (編) C.V. Mosby Co., Gower Medical Publishing, ニューヨーク、London在、19.2-19.18; 22.1-22.10頁を参照されたい）を施すことによって測定することが出来る。同じ患者に、遅延型過敏症試験を施してから、施すと同時に、又は施した後で、即時型過敏症試験を施す。勿論、即時型過敏症試験を施してから遅延型過敏症試験を施すならば、遅延型過敏症試験は、特異的な即時型過敏症反応を示した患者に行なうべきである。遅延型過敏症試験は、ヒト T 細胞刺激活性を有するが、アレルゲンに感受性の患者集団の相当なパーセンテージ（例えば、少なくとも約 75%）においてそのアレルゲンに特異的な I g E に結合しないCanf I若しくはCanf IIの活性を有するペプチドを利用する。特異的即時型過敏症反応及び特異的遅延型過敏症反応の両者を有することが見出された患者には、薬剤投与に適した量の組成物を投与する。この組成物は、遅延型過敏症試験で用いるようなCanf I若しくはCanf IIの活性を有するペプチド及び製薬上許容し得るキャリアー若しくは希釈剤を含む。

Canf I若しくはCanf IIの活性を有するペプチドを、犬鱗屑アレルゲン又は交

差反応性蛋白質アレルギーに対するアレルギー反応を診断し、治療し及び予防する方法

において用いることが出来る。従って、本発明は、Canf I若しくはCanf IIの活性を有する少なくとも1種のペプチドのある量と製薬上許容し得るキャリアーを含む薬剤投与に適した組成物を提供する。脱感作すべき患者への本発明の組成物の投与は、患者の犬鱗屑アレルギーに対する感受性を減少させる（即ち、アレルギー応答を減らす）のに有効な投与量及び期間にて、公知の手順を用いて行なうことが出来る。患者という用語は、免疫応答を誘出させ得る生きた生物例えば哺乳動物を含むものとする。患者の例は、ヒト、犬、猫、マウス、ラット及びこれらのトランスジェニック種を含む。治療効果を達成するのに必要なCanf I若しくはCanf IIの活性を有する少なくとも1種のペプチドの量は、患者の犬鱗屑に対する感受性の程度、年齢、性別及び体重並びにCanf I若しくはCanf IIの活性を有するペプチドが患者において抗原性応答を誘出する能力等の因子によって変化し得る。投薬養生法は、最適治療応答を与えるように調整することが出来る。例えば、幾つかに分けた投与量を毎日投与するか、又は治療状況の緊急性によって投与量をそれに合わせて減じることが出来る。

活性化化合物（即ち、Canf I若しくはCanf IIの活性を有するペプチド）を、従来の方法例えば注射（皮下、静脈注射等）、経口投与、吸入、経皮適用又は直腸投与により投与することが出来る。投与の経路によって、活性化化合物は、その化合物を不活性化し得る酵素、酸その他

の天然条件の作用から保護するための物質でその化合物を被覆することが出来る。

Canf I若しくはCanf IIの活性を有するペプチドを非経口投与以外の投与によって投与するためには、ペプチドをその不活性化を防ぐための物質で被覆するか又は該物質と同時投与することが必要であろう。例えば、Canf I若しくはCanf Iの活性を有するペプチドを、適当なキャリアー、希釈剤又はアジュバントにて個人に投与するか、又は酵素インヒビターと同時投与するか若しくはリポソーム

等の適当なキャリアーにて投与することが出来る。製薬上許容し得る希釈剤は、塩溶液及び緩衝水溶液を含む。アジュバントは、その最も広い意味で用い、インターフェロン等の任意の免疫刺激性化合物を含む。ここで企図するアジュバントは、レゾルシノール、非イオン性界面活性剤例えばポリオキシエチレンオレイルエーテル及びn-ヘキサデシルポリエチレンエーテルを含む。酵素インヒビターは、膵臓トリプシンインヒビター、ジイソプロピルフルオロホスフェート（DEP）及びトラシノールを含む。リポソームは、水中油中水CGFエマルジョン並びに従来のリポソーム（Strejan等、（1984）J.Neuroimmunol.,7:27）を含む。T細胞不応答を誘導する目的のために、この組成物を、好ましくは、非免疫原形態例えばアジュバントを含まない形態にて投与する。

活性化合物は、非経口投与又は腹腔内投与によって投

与することも出来る。分散を、グリコール、液体ポリエチレングリコール及びこれらの混合物並びに油にて調製することが出来る。通常の貯蔵及び使用の条件下において、これらの調製物は、微生物の増殖を予防するための防腐剤を含んで良い。

注射用途に適した製薬組成物は、滅菌水溶液（水溶性の場合）又は分散及び無菌注射溶液若しくは分散を即座に調製するための滅菌粉末を含む。すべての場合に、この組成物は、無菌的でなければならず且つ容易に注射可能である程に流動性でなければならない。それは、製造及び貯蔵条件下で安定でなければならず、細菌及びカビ等の微生物の混入に対して保護されていなければならない。キャリアーは、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール及び液体ポリエチレングリコール等）、これらの適当な混合物並びに植物油を含む溶媒又は分散媒質であって良い。適当な流動性は、例えば、所望の粒子サイズを維持することにより（分散の場合）及び界面活性剤の使用によって維持することが出来る。微生物の作用の予防は、種々の抗細菌剤及び抗カビ剤例えばパラベンス、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チメロサル等によって達成することが出来る。多くの場合に、等張剤例えば糖類、ポリアルコール例えばマンニトール、ソルビトール、塩化ナトリウムを組成物中に

含むことは好ましい。組成物中に吸収を遅らせる薬剤例えばアルミニウ

ムモノステアレート及びゼラチンを含ませることによって、これらの注射可能な組成物の長期間の吸収を達成することが出来る。

活性化化合物（即ち、Canf I若しくはCanf IIの活性を有するペプチド）を所望の量で、上記の成分の1つ又は幾つかの組合せと共に、適当な溶媒中に取り込み、必要ならばその後に濾過滅菌することによって、無菌の注射可能な溶液を調製することが出来る。一般に、分散は、基本的分散媒質及び上記の成分の内の必要なものを含む無菌のビヒクル中に活性化化合物を取り込むことによって調製することが出来る。無菌の注射溶液の調製のための無菌粉末の場合、好適な調製方法は、活性成分（即ち、Canf I若しくはCanf IIの活性を有する少なくとも1種のペプチド）に任意の追加の所望成分を加えた粉末を予め無菌濾過した溶液から生成する真空乾燥及び凍結乾燥である。

Canf I若しくはCanf IIの活性を有するペプチドを上記のように適当に保護した場合には、そのペプチドを、例えば不活性な希釈剤若しくは同化可能な食べられるキャリアーと共に、経口投与することが出来る。ペプチド及び他の成分を、固い若しくは柔らかい殻のゼラチンカプセルに封入し、錠剤に圧縮し又は個人の食事に直接取り入れることも出来る。経口治療投与のために、活性化化合物を賦形剤と共に取り込み、摂取可能な錠剤、口内錠剤、トローチ、カプセル、エリキシル、懸濁液、シロツ

プ、ウエハース等の形態で用いることが出来る。これらの組成物及び調製物のパーセンテージは、勿論、変わり得るが、単位の約5～80重量%が便利である。かかる治療上有用な組成物中の活性化化合物の量は、適当な投与量が得られるようなものである。

「製薬上許容し得るキャリアー」とは、ここで用いる場合、任意のすべての溶媒、分散媒質、被覆剤、抗細菌剤及び抗カビ剤、等張剤及び吸収遅延剤等を含む。製薬上活性な物質に対するかかる媒質及び薬剤の使用は、当業者には周知である。任意の従来媒質及び薬剤は、それらが活性化化合物と相容れない場合を除い

て、これらの治療用組成物におけるそれらの利用は企図される。補足的活性化合物も又これらの組成物中に取り込まれる。

各投与についての投与単位形態で及び均一な投与量で非経口組成物を配合することは特に有利である。投与単位形態とは、ここで用いる場合、治療すべき哺乳動物患者に対する単位投与量として適当な物理的に分離した単位のことをいう（各単位は、所望の治療効果を生じるように計算された予め決めた量の活性化合物を必要な製薬用キャリアーと共に含む）。この発明の投与単位形態について仕様は、（a）活性化合物の独自の特性及び達成すべき特定の治療効果、及び（b）患者の感受性の治療のためのかかる活性成分を混合することの技術上の本質的限界により指図され且つそれらに直接依存する。

本発明は又、Canf I若しくはCanf IIの活性を有する

少なくとも2種のペプチド（例えば、少なくとも2種のペプチドの物理的混合物）（各々T細胞刺激活性を有する）を含む組成物をも提供する。例えば、Canf Iの活性をそれぞれ有する少なくとも2種のペプチドを合わせることが出来、又はCanf IIの活性をそれぞれ有する少なくとも2種のペプチドを合わせることが出来、又はCanf Iの活性を有する少なくとも1種のペプチドとCanf IIの活性を有する少なくとも1種のペプチドとを合わせて投与することが出来る。或は、それぞれT細胞刺激活性を有する少なくとも2つの領域（即ち、各領域は、少なくとも1つのT細胞エピトープを含む）を有するペプチドをアレルギー患者に投与することが出来る。かかるペプチドは、同じアレルゲンCanf I若しくはCanf II又はCanf IとCanf IIの組合せから導いた少なくとも2つの領域を有し得る。少なくとも2つの領域を有する2つのペプチド又は1つのペプチドの組成物を、前述の製薬上許容し得るキャリアーを伴う組成物の形態で、患者に投与することが出来る。1種以上のかかる組成物のある量を、同時に又は順次に、犬鱗屑アレルギーに感受性の患者に投与してかかる感受性を治療することが出来る。

Canf I若しくはCanf IIの活性を有するペプチドをコードするcDNA（又は逆転写においてテンプレートとして働いたmRNA）を用いて、任意の変種若しくは型の動物において、類似の核酸配列を同定し、そうして、Canf I若しくはCa

Canf IIの活性を有するペプチドをコー

ドするcDNAにハイブリダイズするだけ十分な配列相同性を有する遺伝子をクローン化することが出来る。従って、本発明は、Canf I若しくはCanf IIの活性を有するペプチドを含むだけではなく、本発明のDNAにハイブリダイズするDNAによりコードされるアレルゲンであり得る他の蛋白質をも含む。

抗体交差反応性又はT細胞交差反応性等によりCanf I若しくはCanf IIに免疫学的に関連する単離されたペプチド（既に同定されたものを除く）は、この発明の範囲内にある。かかるペプチドは、この発明の蛋白質及びペプチドに特異的な抗体と結合し、又はこの発明の蛋白質及びペプチドに特異的なT細胞を刺激する。

Canf I若しくはCanf IIの活性を有するペプチド（即ち、組換え又は化学合成により生成したCanf I若しくはCanf II）は、他のすべての犬鱗屑蛋白質を含まず、従って、犬鱗屑過敏症の診断及び治療に対して鍵となる試薬であるアレルゲン抽出物の標準化に有用である。更に、かかるペプチドは、一貫して、治療目的（例えば、犬鱗屑に感受性の患者のアレルギー応答を改変する等）のために投与することの出来る調製物における利用のための十分規定された組成及び生物学的活性のものである。かかるペプチドは又、*Canis familiaris*アレルギーの免疫療法の機構を研究するために及び免疫療法において有用な修飾された誘導体若しくはアナログをデザインするために利用することも出来る。

他の研究者の仕事は、一般に、アレルゲン抽出物の高投与量が免疫療法において最良の結果（即ち、最大の症状の軽快）を生じるということを示した。しかしながら、多くの患者は、かかる抽出物の多量投与には、これらの調製物中のアレルゲン及び他の成分により誘出される全身性反応のために絶えることが出来ない。この発明のCanf I若しくはCanf IIの活性を有するペプチドは、他のすべての犬鱗屑蛋白質を含まないという利点を有する。従って、かかるペプチドは、治療目的のために投与することが出来る。

今や、感受性患者においてアレルギー反応を誘導する犬鱗屑アレルゲンの能力

をブロックし又は阻止することの出来る薬剤をデザインすることも可能である。かかる薬剤は、例えば、それらが関連抗Canf I若しくは抗Canf II Ig E分子に結合し、そうして、Ig E-アレルギー結合及びその後のマスト細胞/好塩基球の脱顆粒を妨げるような仕方でデザインすることが出来るであろう。或は、かかる薬剤は、免疫系の細胞成分に結合して、犬鱗屑アレルギーに対するアレルギー応答の抑制若しくは脱感作を生じ得るであろう。この非応答性の例は、Canf I若しくはCanf IIのB若しくはT細胞エピトープを含むペプチド又はそれらの修飾物の利用である（犬鱗屑アレルギーに対するアレルギー応答を抑制するCanf I若しくはCanf IIのcDNA蛋白質構造に基づく）。これは、犬鱗屑に感受性の患者に由来する血液成分を用いるイン

・ピトロでの研究においてB及びT細胞機能に影響を与えるB及びT細胞エピトープをコードする断片の構造を規定することによって実施することが出来よう。

この発明を、更に、下記の実施例によって説明するが、この主題発明を制限するものと解釈してはいけない。この出願において引用されているすべての参考文献及び公開された特許出願の内容を、参考としてここに援用する。

#### 実施例 1：精製したCanf Iの蛋白質配列分析

アフィニティー精製したCanf I蛋白質をAalberse博士から得た（de Groot,H.等、前出）。Applied Biosystems Model 477A気相シーケンサーをオンラインフィニルチオヒダントイン（HTH）アミノ酸分析（Model 120A）と共に用いて、精製したCanf I蛋白質を配列決定した。抽出プログラム、多重ブチルクロリド抽出の変法を用いてアミノ酸回収を改善した。プロリンがアミノ末端に位置する場合には、第1アミンのブロックにO-フタルアルデヒド（OPA）を用いた。Brauer,A.W.等（1984）Anal.Biochemistry,137:134,142。イン・シトゥーアルキル化を、非求核性還元剤トリブチルホスフィンと4-ビニルピリジンによる同時アルキル化と共にエチルモルホリン緩衝液中で行うことによって行なった。Andrews,P.C.及びDixon,J.E.,（1987）Anal.Biochemistry,161:524-528。

この方法論を用いて、N末端がブロックされているという以前の報告（Schou,

C.等、前出)に反して、Canf I蛋白質のN末端の配列を決定した。夾雑シグナルのO P Aブロッキングと共に複数のN末端配列分析により同定された65アミノ酸残基のN末端配列は、新規な蛋白質配列を表している(図5)。このCanf I蛋白質配列は、C N B r開裂ペプチドの配列分析により確認され拡張された。シーケンスガラスフィルターディスク上でのCanf Iのイン・シトゥーC N B r消化は、更なる蛋白質配列情報を提供した。Simpson, R.J.及びNice, E.C. (1984) Biochem. International, 8:787-791。イン・シトゥーC N B r開裂の前に、44サイクルのアミノ酸配列決定を行ない、次いで、蛋白質試料をO P Aで処理してすべてのアミノ基をブロックした。イン・シトゥーC N B r消化の5時間後に、Met 46、Met 30及び未知のMetの後ろの配列(後に、Met 103であることが示された)に相当する3つの主要な配列を同定した。18サイクルの後の更なるO P Aブロック(P r o 65の前)は、A s p 86までの配列に達した。H P L C (Applied Biosystem, Inc., Model 130, C8カラム)で分離したC N B rペプチド断片の配列分析は、更に、N末端配列を94アミノ酸残基まで拡張した。O P Aブロッキングを伴うイン・シトゥーC N B r開裂は又、39アミノ酸残基のペプチド(残基104~142)をも同定した。潜在的Nグリコシル化部位が、c D N Aから演繹

されたアミノ酸配列中に見出された(A s n 54 - I l e 55 - T h r 56)。蛋白質配列分析は、Canf IのI l e 55及びT h r 56を同定したが、54位では何も同定し得なかった。これは、翻訳後修飾が、Canf IのA s n 54で起きること及びその修飾が蛋白質配列決定中のトリフルオロ酢酸処理に対して安定であることを示唆する。

## 実施例2：イヌ耳下腺からのm R N Aの抽出及び

### Canf Iのクローニング

異系交配により得られた1匹の犬からの一対の新鮮な耳下腺をTufts University School of Veterinary Medicine (マサチューセッツ、Worcester在)から得て、リン酸緩衝塩溶液にて洗浄し、ドライアイス上で直ちに凍結した。R N Aを、本質的



に文献 (Chirgwin, J.M. 等、(1979) Biochemistry, 18:5294-5299) に記載されたようにして抽出した。一方の腺を液体 N<sub>2</sub> で冷凍した乳鉢と乳棒で粉碎して粉末にし 25 ml の GTC 緩衝液 (50% w/v グアニジンチオシネート、0.5% w/v Na ラウリルサルコシン、0.7% v/v β-メルカプトエタノール、0.1% v/v Sigma Antifoam A、25 mM クエン酸ナトリウム、pH 7.0) に懸濁して溶解するまでボルテックスミキサーにかけた。この溶液中に存在するゲノム DNA を、溶液の粘性がもはや低下しなくなるまで溶液を 16 ゲージの注射針を通すことにより剪断した。この剪断した溶液を 3 K r p m で 5 分間、室温で遠心分離した。次いで、上清を、もはや粘性が低下しなくなるまで 23 ゲージの注射針を通して剪断し、5 K r p m で 5 分間、室温で遠心分離して澄ませた。この溶液を CsCl クッション (5.7 M CsCl、10 mM EDTA pH 7.5) 上に重層して、Beckman SW41 Ti ローターにて 35 K r p m で 16 時間 20℃ で超遠心分離した。上清を捨て、RNA

ペレットを 70% EtOH で洗い、次いで、0.3 M NaOAc、10 mM EDTA) 0.1% SDS 中に再懸濁した。2 容の無水 EtOH を加えて、ドライアイス上で沈澱を行なった。RNA を遠心分離によりペレット化し、70% EtOH で洗い、そして TES (10 mM トリス、1 mM EDTA、0.1% SDS) 中に再懸濁した。最終的収量は、~1.8 mg であった。

一本鎖の全犬耳下腺 cDNA を、上記の RNA 調製物をテンプレートとして用いて逆転写にて合成した。4 μg の全 RNA を EtOH 沈殿し (Boehringer Mannheim 製 グリコーゲン (分子生物学用) をキャリアーとして使用)、70% EtOH で洗い、そして 10 μl の dH<sub>2</sub>O に再懸濁した。オリゴ dT (12~18) を 50 μg/ml に加えて RNA を 70℃ で 5 分間変性した。反応液を氷上で急速冷却し、1 μl (40 単位) の RNA sin (Promega) を夾雑 RNA ーゼに対する予防剤として加えた。BRL スーパースクリプト (商標) 逆転写酵素キットからの成分を次のように加えた: 4 μl の 5×緩衝液、2 μl の 0.1 M DTT、1 μl の 10 mM dNTP 混合物。反応液を 37℃ に加温した後に、1 μl (200 単位) のスーパースクリプト (商標) 逆転写酵素を加え、反応を 3

7℃で1時間進行させた。逆転写を70℃で15分間インキュベートすることにより停止させ、-20℃に保存した。

最初に、PCR増幅 (Lee, C.C.等、(1988) Science, 239:1288-1291) のMOPAC (混合オリゴヌクレオチドでプライムしたcDNAの増幅) 技術を用いて、成熟蛋白質のアミノ酸14～29をコードするCanf Iの部分的cDNAを得た。犬耳下腺cDNAをテンプレートとして、成熟Canf Iの残基9～15 (SEQ ID NO:3) [図1、S1A (SEQ ID NO:4) 又はS1B (SEQ ID NO:5)] 及び30～37 (SEQ ID NO:10) [図1、AS2A (SEQ ID NO:11) 又はAS2B (SEQ ID NO:12)] に基づく縮重したプライマー対 (Applied Biosystems 392にて合成) と共に用いて、予想されるサイズ (～3×28アミノ酸即ち84bp) のDNA断片を、PCRキット (GeneAmp kit, コネカット、Norwalk在、Perkin Elmer Cetus) を、次のプログラムと共に、MJ Researchミニサイクラーにて用いて増幅することが出来る: 40×(92℃ 30秒/55℃ 1分間/75℃ 1分間)。プライマー対5' S1B/3' AS2Bは、予想される断片を最大効率にて増幅したが、これから、両コード領域においてロイシン残基がTT (A又はG) ではなくCTXによりコードされていることが推論される。确实性の試験として、増幅した断片を、サザンブロット上にて、T4ポリヌクレオチドキナーゼを用いてγ-<sup>32</sup>P ATPで標識した内部縮重オリゴヌクレオチドプローブDogプローブ1 (SEQ ID NO:7) [Canf Iの残基17～24 (SEQ ID NO:6) に基づく] とハイブリダイ

ズさせた。増幅した断片をブルースクリプトKSプラスミッドベクター (カリフォルニア、San Diego在、Stratagene) 中にサブクローン化した後に、Sangerのジデオキシターミネーターキット (オハイオ、Cleveland在、USB) を用いて配列決定し、成熟Canf Iの残基16～29を正確にコードしていることを示した。

同様に、精製したCanf Iのアミノ酸配列分析が成熟蛋白質の残基94まで達する配列情報を生成したときには、延長された部分的Canf IcDNA (残基14～87) のMOPAC PCR増幅において、新たなプライマー対を用いた。5'

又はセンスプライマー S A (残基 14 ~ 20) 及び S B (残基 21 ~ 27) は、公知の Canf I の部分的 c D N A 配列に基づくネストした対であり、他方、3' 又はアンチセンスプライマー A S 3 A (SEQ ID NO:13) (図 1) 及び A S 3 B (SEQ ID NO:14) (図 1) は、残基 88 ~ 94 に基づく縮重オリゴヌクレオチドであった。ネストした 5' センスオリゴを単一の 3' アンチセンス縮重プライマーと共に用いる 1 対の連続反応において上記の条件を用いる P C R のシーケンシャルラウンドにおいて (最初の反応の 1 / 100 を、第 2 の反応のためのテンプレートとして用いた)、予想されるサイズ (3 × 80 アミノ酸即ち 240 b p) の D N A 断片を増幅することが出来る。縮重 3' アンチセンスオリゴ A S 3 B は、オリゴ A S 3 A よりも、部分的内部 Canf I c D N A を増幅するための 5' センスオリ

ゴの連続した対と協力させた場合に、一層効率的であったが、これはやはり、ロイシン残基が T T (A 若しくは G) ではなく C T X によってコードされていることを示唆する。この 240 b p D N A 断片を、ブルースクリプト K S プラスミッドベクター中にサブクローン化して、上記のように配列決定した。やはり、確実な Canf I c D N A であることが判明した。残基 54 における Canf I のアミノ酸配列中の失われた残基がアスパラギンであることを、次の根拠に基づいて決定した：1) 蛋白質配列分析中に残基 54 には、アミノ酸シグナルが見出されなかったこと；及び 2) アスパラギン残基が、N 結合グリコシル化のコンセンサス配列 (N 54 I 55 T 56) 内にあること。これらのデータは、N 54 残基が N 結合グリコシル化によって修飾されていることを強く示唆している。

Canf I c D N A の 3' 部分を得るために、R A C E (c D N A 末端の急速増幅) P C R プロトコルを用いた (Frohman, M.A. 等、(1988) Proc. Natl. Acad. Sci. 85:8998-9002)。全犬耳下腺 R N A からの第 1 鎖 c D N A 合成を上記のようにして行なった、但し、J M 3 オリゴヌクレオチドを反応のプライマーとしてオリゴ d T の代わりに用いた。J M 3 プライマー (SEQ ID NO:22) は、オリゴ d T 域の 5' 側にコードされた ~ 40 ヌクレオチドの自由域を有する (図 2)。それ故、c D N A を作成するためのポリ A + R N A のプライミングに際して、こ

の既知のヌクレオチド標識を、発生中の c D N A 転写物の 5' 末端に共有結合する。M O P A C P C R 分析からの既知の Canf I c D N A 配列に基づくネストした 5' プライマー S D (残基 73 ~ 79 (SEQ ID NO:15)) 及び S E (残基 80 ~ 86 (SEQ ID NO:17)) 並びに既知の J M 3 プライマー配列 (J M 3 - 1 (SEQ ID NO:23) 及び J M 3 - 3 B a m (SEQ ID NO:24)) に基づくネストしたプライマーを上記の P C R 反応で用いて (但し、P C R プログラムは、40 × [92℃ 30 秒 / 60℃ 1 分間 / 75℃ 1 分間])、~500 b p の長さの D N A 断片を増幅した。キナーゼ標識した縮重オリゴヌクレオチド D o g プローブ 2 (SEQ ID NO:9) [成熟 Canf I の残基 88 ~ 94 (SEQ ID NO:8)] に対するプローブ試験をしたとき、このバンドは、ハイブリダイゼーションについて陽性であることが判明した。プラスミッドベクター中にサブクローン化して D N A 配列分析したところ、3つの異なる部分的 3' Canf I c D N A が同定された：Canf I (SEQ ID NO:61)、2 Canf I (SEQ ID NO:62) 及び 3 Canf I (SEQ ID NO:63) (それぞれ、図 9 に示してある)。2 Canf I は、メチオニン残基とその後ろに続くアスパラギン-プロリン対をコードする配列を有した。これらの蛋白質配列分析についての境界標識残基は、次のことを予言した：1) N H<sub>2</sub>末端配列 M A K L L G R D P E Q . . . (SEQ ID NO:64) を有する C N B Γ 断片；2) D P 対における酸感受性開裂部位；

及び 3) O P A 処理に無反応性であると判明し、他のすべての N H<sub>2</sub>末端はその処理によりブロックされるアミノ酸配列データを生成するプロリン残基。実際、精製 Canf I の更なる蛋白質配列分析は、内部プロリン残基における O P A 封鎖と共に配列 (M) A K L L G R D P E Q S Q E A L E D F ( ) E F S ( ) A K G L N Q E I L E L A Q S (E) T (SEQ ID NO:65) を有する C N B r 断片を同定した。精製蛋白質の酸開裂は、配列 (D) P E Q S (E) E A (SEQ ID NO:66) を有するペプチドを産生した。これらの蛋白質配列分析及び Canf I の部分的 c D N A クローニングからの補足データは、Canf I c D N A の信頼すべき 3' 末端が単離されていないことを示した。

精製 Canf I の配列決定からのアミノ酸配列データと部分的 c D N A 2 Canf I 及

び3Canf Iによりコードされたものとの比較は、3' cDNAの多数の種が発生期のCanf I転写物の別のスプライシングであったことを暗示した(部分的cDNA 3Canf Iにおいて、どのようにCNBr断片のNH<sub>2</sub>末端からの残基が、中間残基なしで、断片のCOOH末端残基に結合して見出されているかに注意されたい)。この別のスプライシングのレベルに起源を有する複数のcDNAの仮説と対照的に、Canf IcDNAの3'末端の上記のPCR増幅は、単一の顕著な~500bp長のDNA断片を生成した。しかしながら、3つの部分的3' cDNAは、500bpより有

意に長い又は短いものであった。これは、恐らく信頼すべきCanf IcDNAが、PCR増幅により発生するDNA断片のサブクローニングで用いるプライマーの末端にてコードされる制限部位を有するので、稀な部分的cDNAがサブクローン化されたことを示唆した。それ故に、信頼すべきCanf IcDNAを表すPCR生成物を制限エンドヌクレアーゼ(この場合には、5' EcoRI及び3' BamHI)で消化したときに、1) 信頼すべきCanf IcDNAは少なくとも2つの断片に切断され、2) 欠失したEcoRI及び/又はBamHI部位を含むエキソンを有する発生期のCanf IRNA転写物の別のスプライシングから発生した稀なcDNAがサブクローン化される傾向がある。この状況を扱うために、5'末端に種々の制限酵素部位を有する新たなプライマーを合成してCanf IcDNAの3'末端のRACEPCRにおいて使用した。JM3-3オリゴを、BglIIを5'末端に結合して再合成した[J M 3-3 X B (SEQ ID NO:21)] (図2)が、他方、5'プライマーSD及びSEを、5'末端にXhoI部位を用いて再合成した[X S D (SEQ ID NO:16) 及びX S E (SEQ ID NO:18)] (図2)。これらの新たなプライマー及び以前の増幅条件を用いて、JM3のネストしたPCRが全犬耳下腺cDNAをプライムした後に、キナーゼ標識したDogプローブ4 [(SEQ ID NO:20)、成熟Canf I (SEQ ID NO:19)の残基115~121]にハイブリダ

イズするCanf IcDNAの完全な3'末端をサブクローン化して配列決定した。

部分的 c D N A の翻訳されたアミノ酸配列は、蛋白質配列データと直に一致し、停止コドンに出会う前に更なる 6 アミノ酸を延長した。クローニングアーティファクトが予想されたので、E c o R I 及び B a m H I 部位の両者は、完全な 3' Canf I c D N A のコード領域内に見出された。

Canf I c D N A の 5' 末端を、アンカード P C R 技術 (Roux, K. H. 及び Dhanarajan, P., (1990) Biotechniques, 8:48-57; Rafnar, T. 等、(1991) J. Biol. Chem. 226:1229-1236) を用いてクローン化した。二本鎖の犬耳下腺 c D N A を、キット (BRL スーパースクリプト c D N A 合成システム) を利用して、c D N A の第 2 鎖合成の R N アーゼ H プライミングの方法 (Gubler, U., 及び Hoffman, B. J., (1983) Gene, 25:263-269) を用いて合成した。鈍端二本鎖 c D N A をアンカーアダプターにライゲーションし、それにより、既知の配列を c D N A の 5' に位置させた (SEQ ID NO:25; SEQ ID NO:26; 及び SEQ ID NO:27) (図 3 参照)。アンカー配列に基づくプライマーを、5' センスプライマー (A P) として 3' アンチセンスプライマー A S A (SEQ ID NO:31) [残基 18 ~ 24 (SEQ ID NO:30)] 及び A S B (SEQ ID NO:33) [残基 25 ~ 30 (SEQ ID NO:32)] のネストした対 (P C R のシーケンシャルラウンド (40 × [92℃ 30 秒 / 60℃ 1 分間 / 75℃ 1 分

間]) における M O P A C P C R からの既知の Canf I c D N A 配列に基づく) と共に用いて、Canf I c D N A の 5' 末端を増幅した (1° 反応 d s アンカード c D N A テンプレートで 5' A P / 3' A S B プライマー使用; 2° 反応 1 / 100 の 1° 反応のテンプレートで 5' A P / 3' A S A プライマー使用)。2° 反応のアガロースゲル電気泳動分析は、~ 300 b p 長のブロードなバンドを示したが、それは、サザンブロット分析において、成熟 Canf I の残基 9 ~ 17 (SEQ ID NO:28) に基づく <sup>32</sup>P キナーゼ処理した縮重オリゴヌクレオチドプローブ D o g プローブ 0 (SEQ ID NO:29) (図 3) とハイブリダイズした。増幅した断片を、ブルースクリプト K S プラスミッド中にサブクローン化し、D N A 配列分析にかけた。その Canf I c D N A の 5' 末端としての確実性を、その部分的 c D N A の 3' における成熟 Canf I 蛋白質の最初の 13 残基の存在により確認した。

最長の部分的 5' cDNA の配列は、更に、126bp 延長し、成熟 Canf I 中には見られない 26 アミノ酸のリーダー配列をコードした。インフレームの停止コドンは、仮のイニシエーターメチオニンコドン (M-26) の 5' 側に見出されなかったが、それは、次の理由により、真のイニシエーターコドンであり、内部メチオニンコドンではない：1) それは哺乳動物細胞における翻訳開始のためのコンセンサス配列 (Kozak, M., (1986) Cell, 44:283-292) 内に埋め込まれており；

2) 予想されるリーダー配列が、Canf I と高度に関係する蛋白質のリーダー配列と高度に相同性である (下記参照)。

次いで、隣接する Canf I cDNA を増幅し、両鎖を PCR 生成物として直接配列決定して分子のコード配列を確認した。PCR 反応中に増幅された cDNA 中に誤りが導入される可能性を最小にするために、PfuI DNA ポリメラーゼ (カリフォルニア、San Diego 在、Stratagene) を用いてコード cDNA を増幅した。PfuI DNA ポリメラーゼは、PCR 中に Taq DNA ポリメラーゼよりも大幅に少ないオーダーの誤りしか導入しないことが文献に示されている (Lundberg, K.S., (1991) Gene, 108:1-4)。PCR 反応からのクローン化されない DNA 断片の直接配列決定についても、PCR 中に DNA ポリメラーゼにより為される任意の誤りを未然に防ぐべきである。何故なら、かかる誤りは、PCR 生成物の集団中にランダムに分散されるからである (Gyllensten, U.B., 及び Ehrlich, H.A., (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:7652-7656)。増幅/配列決定に用いられたプライマーは、5' センス leader ex オリゴ (SEQ ID NO:35) [Canf I の残基 -26 ~ -20 (SEQ ID NO:34)] 及び 3' アンチセンス stop BglII オリゴ (SEQ ID NO:36) [Canf I の停止コドンの 3' 側 40bp の 24 量体] (図 4) を含んだ。プログラム 40 × (95℃ 30 秒 / 60℃ 45

秒 / 75℃ 45 秒) を上記のプライマー及び PfuI DNA ポリメラーゼと共に用いて、~600bp 長の DNA 断片を増幅し、続いてそれを 0.6% 低融点アガロースゲル上でバンドとして単離した。このゲルスライスを 70℃ で溶融し、

$^{32}\text{P}$  標識したオリゴヌクレオチドをプライマーと市販のキット (AmpliTaqサイクルシーケンシングキット、コネカット、Norwalk在、Perkin Elmer Cetus) を用いる PCR 配列決定のためのテンプレートとして利用した。プログラム  $30 \times (95^\circ\text{C} \quad 30 \text{ 秒} / 60 \text{ 若しくは } 68^\circ\text{C} \quad 30 \text{ 秒})$  をサイクルシーケンシングに用いた。増幅した cDNA の両鎖からの成熟 Canf I 蛋白質の明確な配列を得るための PCR 配列決定ストラテジーを、下記のセンスプライマー: start ex (SEQ ID NO:37) ; SB (SEQ ID NO:38) ; SK (SEQ ID NO:39) ; SE (SEQ ID NO:40) ; 及び SH (SEQ ID NO:41) 並びにアンチセンスプライマー: Dog 9 (SEQ ID NO:42) ; ASK (SEQ ID NO:43) ; ASB (SEQ ID NO:44) ; 及び ASJ (SEQ ID NO:45) を用いて図 4 に示した。成熟 Canf I 蛋白質をコードする増幅した cDNA の PCR サイクルシーケンシング分析は、Canf I のクローン化部分的 cDNA から以前に得られた DNA 配列を確認するための役に立った (図 4)。

Canf I の可能な生物学的機能を推論するために、そのアミノ酸配列を GenBank , GenBankUpdate, EMBL, 及び EMBL Update 配列データベースの配列 (92 年 6 月 25

日) と、NCBI BLAST ネットワークサービスを利用して比較した (Altschul, S.F., 等、(1990) J.Mol.Biol., 215:403-410)。Canf I 前駆体蛋白質 (成熟 Canf I 蛋白質中に見出されないシグナル配列を含む) は、次の 3 つの蛋白質と強い相同性を示した: 1) ヒトの von Ebner 腺蛋白質; 2) ラット (V E G) の von Ebner 腺蛋白質前駆体 (Hartwig, S. 等、(1990) Nature, 343:366-369); 及び 3) ラットの臭気物質結合蛋白質 (Pevsner, J. 等、(1988) Science, 241:336-339)。von Ebner 腺は、舌下腺であり、疎水性分子を含む味覚の強化に関与すると思われる多量の蛋白質を唾液中に分泌する。von Ebner 腺蛋白質は、脂質親和性分子キャリアーのスーパーファミリーに属する (Godovac-Zimmermann, J., (1988) Trends Biochem.Sci., 13:64-66)。Canf I とヒト及びラットの von Ebner 腺蛋白質との間の相同性は、Canf I がイヌの von Ebner 腺蛋白質の類似物であり得ることを示している。更なるデータは、Canf I mRNA が、von Ebner 腺が局在する舌上皮組織



において優勢に発現されており、耳下腺では極めて低レベルでしか発現していない（ノーザンブロット分析で検出不能）ことを示している。

### 実施例3：精製したCanf IIの蛋白質配列分析

アフィニティー精製したCanf I蛋白質をAalberse博士から得た（de Groot, H. 等、前出）。Applied Biosystems Model 477A気相シーケンサーをオンラインフィニルチオヒダントイン（HTH）アミノ酸分析（Model 120A）と共に用いて、精製したCanf I蛋白質を配列決定した。抽出プログラム、多重ブチルクロリド抽出の変法を用いてアミノ酸回収を改善した。プロリンがアミノ末端に位置する場合には、第1アミンのブロックにO-フタルアルデヒド（OPA）を用いた。Brauer, A.W. 等（1984）Anal. Biochemistry, 137:134, 142。イン・シトゥアルキル化を、非求核性還元剤トリブチルホスフィンと4-ビニルピリジンによる同時アルキル化と共にエチルモルホリン緩衝液中で用いることによって行なった。Andrews, P.C. 及びDixon, J.E.,（1987）Anal. Biochemistry, 161:524-528。

この方法論を用いて、Canf II蛋白質のN末端の配列を決定した。夾雑シグナルのOPAブロッキングと共に複数のN末端配列分析により同定された38アミノ酸残基のN末端配列は、新規な蛋白質配列（SEQ ID NO:88）を表している（図19）。

### 実施例4：イヌ耳下腺からのmRNAの抽出及び

#### Canf IIのクローニング

Canf IIをクローニングするためのストラテジーを図14に示す。cDNAを、上記の調製物を逆転写におけるテンプレートとして使用して合成した。次の工程において、dsDNAをPCR用のテンプレートとして、Canf IIのアミノ酸配列に基づいてデザインし且つ方向

付けた縮重プライマーと共に用いてCanf II cDNAの断片を増幅した。PCR生成物をゲル精製し、次いで、直接配列決定にかけた。ヌクレオチド配列は、PCR生成物がCanf II cDNAの断片を表すことを確実にした。更なるポリメラーゼ連鎖反応を、一層長い断片を得るためにCanf II特異的プライマーを用いて

行ない、続いて、それをプローブとして用いて犬 cDNA ライブラリーをスクリーニングした。陽性クローンを同定し、ブランク精製し、配列決定して完全長の Canf II cDNA を得た。

異系交配により得られた 1 匹の犬からの新鮮な耳下腺を Tufts University School of Veterinary Medicine (マサチューセッツ、Worcester 在) から得て、リン酸緩衝塩溶液にて洗浄し、ドライアイス上で直ちに凍結した。RNA を、本質的に文献 (Chirgwin, J.M. 等、(1979) Biochemistry, 18:5294-5299) に記載されたようにして抽出した。2 つの腺 (約 50 g) を液体 N<sub>2</sub> で冷凍した乳鉢と乳棒で粉砕して粉末にし 25 ml の GTC 緩衝液 (50% w/v グアニジンチオシネート、0.5% w/v Na ラウリルサルコシン、0.7% v/v β-メルカプトエタノール、0.1% v/v Sigma Antifoam A (ミ-リ、St. Louis 在、Sigma)、25 mM クエン酸ナトリウム、pH 7.0) に懸濁して溶解するまでボルテックスミキサーにかけた。この溶液中に存在するゲノム DNA を、溶液の粘性がもはや低下しなくな

るまで溶液を 16 ゲージの注射針を通すことにより剪断した。この剪断した溶液を 3 K r p m で 5 分間、室温で遠心分離した。次いで、上清を、もはや粘性が低下しなくなるまで 23 ゲージの注射針を通して剪断し、5 K r p m で 5 分間、室温で遠心分離して澄ませた。この溶液を CsCl クッション (5.7 M CsCl、10 mM EDTA pH 7.5) 上に重層して、Beckman SW41 Ti ローターにて 35 K r p m で 16 時間 17℃ で遠心分離した。上清を捨て、RNA ペレットを 70% EtOH で洗い、次いで、0.3 M NaOAc、10 mM EDTA、0.1% SDS 中に再懸濁した。2 容の無水 EtOH を加えて、ドライアイス上で沈澱を行なった。RNA を遠心分離によりペレット化し、70% EtOH で洗い、そして TES (10 mM トリス、1 mM EDTA、0.1% SDS) 中に再懸濁した。最終的収量は、全 RNA の ~5.3 mg であった。mRNA を全 RNA からオリゴ (dT) セルロースカラム上のクロマトグラフィーにより、Aviv, H. 及び Leder, P. により記載された方法 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1972) 69:1408) を用いて単離した。20 μg のポリ (A) RNA を 1.7 m

g の全 R N A から得た。

腺ポリ (A) m R N A の二本鎖 c D N A への変換は、標準的手順 (Ausubel等、(1993) Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons) を用いて行なった。第1に、ポリ (A) R N A を c D N A にコピーす

るのは、Amersham c D N A 合成システムプラスを用いて製造者の手順に従って行なった。4  $\mu$  g のポリ (A) R N A をテンプレートとして用い且つオリゴ d T (12~18) を用いて第1鎖合成をプライムした。R N A / D N A ハイブリッド中の R N A を R N アーゼ H により除去し、第2鎖を D N A ポリメラーゼ I により合成した。二本鎖 c D N A を完成し、T4 D N A ポリメラーゼ及び大腸菌 D N A リガーゼにより鈍端化した (Gubler, U. 及び Hoffman, B. J., (1983) Gene, 25:263)。

最初に、P C R 増幅 (Mullis, K. B. 及び Faloona, F., (1987) Methods Enzymol, 155:355-360) を用いて、成熟蛋白質のアミノ酸16~29 (SEQ ID NO:97) をコードする Canf II の部分的 c D N A を得た。犬耳下腺 c D N A をテンプレートとして、成熟 Canf II の残基3~6 (S1A) (図13) (SEQ ID NO:91) 及び (S1B) (図13) (SEQ ID NO:92) 並びに残基33~38 (ASP2A) (図13) (SEQ ID NO:93) 及び (ASP2B) (図13) (SEQ ID NO:94) に基づく縮重したプライマー対 (Applied Biosystems 392にて合成) と共に用いて、予想されるサイズ (~120bp) の D N A 断片を、P C R キット (GeneAmp kit, コネカット、Norwalk在、Perkin Elmer Cetus) を用いて増幅した。反応のための条件は: 94℃で1分間の変性、42℃で1分間のアニーリング及び72℃で1分間の重合であった。このサイクルを30回繰り返した。确实性の試験として、増

幅した断片を、市販のキット (AmpliTaq サイクルシーケンシングキット、コネカット、Norwalk在、Perkin Elmer Cetus) 与えられた指示に従ってを用いる直接配列決定にかけた。増幅/配列決定において使用するプライマー (S1A、S1B、ASP2A 及び ASP2B を含む) を、T4 ポリヌクレオチドキナーゼを用いて

$\gamma$ - $^{32}$ P ATPで末端標識した。次の19サイクルのプログラム（95℃で1分間の変性、50℃で1分間のアニーリング及び72℃で15秒間の伸長）を、MJリサーチミニサイクラーにてサイクルシーケンシング用に用いた。約40ヌクレオチドの断片のヌクレオチド配列が成熟Canf II（SEQ ID NO:97）の残基16～29を正確にコードしていることが示された。天然蛋白質のアミノ酸配列中の26位の欠失した残基は、アスパラギンであることが見出された。

cDNAライブラリーをスクリーニングするために用いるのに十分な長さ（>100bp）のCanf II特異的なプローブを生成するために、Canf II cDNAの5'及び3'末端を、アンカードPCR技術（Roux, K. H. 及びDhanarajan, P., (1990) Biotechniques, 8:48-57; Rafnar, T. 等、(1991) J. Biol. Chem. 226:1229-1236）を用いてクローン化した（図15）。二本鎖の犬cDNAを上記のようにして合成した。鈍端二本鎖cDNAをアンカーアダプターAT/AL（図16；SEQ ID NO:96及び102）にライゲーションし、それにより、既知の配列を

cDNAの5'及び3'末端に位置させた（図15A）。Canf II cDNAの5'末端を得るために、アンカー配列AP2（図16）（SEQ ID NO:95）に基づくプライマーを5'プライマーとして、3'アンチセンスプライマーD2-1（残基22～30）（図13及び16）（SEQ ID NO:74）、D2-2（残基17～25）（図13及び16）（SEQ ID NO:75）及びD2-3（残基16～21）（図13及び16）（SEQ ID NO:76）（初期PCRから得た既知のCanf II cDNA配列に基づく）と共に用いた。PCRのシーケンシャルラウンド（40×[92℃ 30秒/60℃ 1分間/75℃ 1分間]）を実施してCanf II cDNAの5'末端を増幅した。1°反応において、二本鎖アンカードcDNAをテンプレートとして、5'AP2/3'D2-1プライマーと共に用いた；2°反応においては、1°反応混合物の1/20を5'AP2/3'D2-2プライマーと共に用いた；3°反応においては、2°反応混合物の1/20をAP2/D2-3プライマーと共に用いた。反応生成物の1%アガロースゲル電気泳動は、～300bp長の単一バンドの存在を示した。プライマーの位置から予想されるように（図15参照）、2°及び3°反応生成物は、1°反応生成物より早く移動し

た。3° 反応からの増幅断片をゲル精製し、P N A 配列分析にかけた。その Canf II c D N A の 5' 末端としての確実性を、成熟 Canf II 蛋白質の N 末端残基の存在 (図 1 5

A、影を付けた残基) により確認した。c D N A の 5' 部分 (図 1 5 A) (SEQ ID NO:98) は、成熟 Canf II 中には見出されないアミノ酸シグナル配列の部分をコードしていた。Canf II (図 1 5 B) (SEQ ID NO:99) の 3' 部分を、5' 末端と同様の方法で合成した。但し、一本鎖 c D N A をテンプレートとして用い、A P A (図 1 6) (SEQ ID NO:100) を 3' プライマーとして用い、そして、D 2-4 (SEQ ID NO:77)、D 2-5 (SEQ ID NO:78) 及び D 2-6 (SEQ ID NO:79) (図 1 4 及び 1 6) を P C R における内部プライマーとして用いた。3° 反応からの P C R 生成物の直接配列決定は、既知の Canf II 配列の 8 アミノ酸及びその下流の既知の配列の 8 アミノ酸の存在を示した。

完全長 Canf II c D N A をクローン化するために、c D N A ライブラリーを調製し、標準的な公開された手順 (Gubler 及び Hoffman, Ausubel 等、前出) を用いてスクリーニングした。ラムダ c D N A ライブラリーを、Clontech Laboratories, Inc. に依頼して次のように作成した: 第 1 鎖 c D N A をポリ (A) R N A からオリゴ d (T) 1 5 によりプライムした。鈍端二本鎖 c D N A を E c o R I リンカー-CCGGAATTCCGGSEQ (ID NO:101) にライゲーションし、E c o R I で消化し、5 0 0 b p より大きい断片を得るためにサイズで選択し、そして、E c o R I 切断して脱リン酸化したベクター  $\lambda$  g t 1 0 にライゲーションした。この D N A を、次いで、ラムダ

粒子内にパッケージングして、C690-hfl 及び C-600 大腸菌株上にプレートし、そして、ライブラリーの力価を測定した。この非増幅ライブラリーは、0.6 kb から 3~4 kb のサイズに及ぶ挿入物を含む  $1.53 \times 10^6$  の独立のクローン (C-600hfl 宿主上の透明ブラーク) からなった。挿入物の平均サイズは、Clontech  $\lambda$  g t 1 0 プライマーを用いて P C R により測定して 1.2 kb であった。100,000 クローンを C-600hfl 宿主上にプレートし、Canf II 特異的プローブ

を用いてスクリーニングした。Canf II cDNAのクローニング及び配列決定をするための操作は、Protocols in Molecular Biology (Ausubel等、前出)に従って行なった。Canf IIプロンプを、D2-9 (SEQ ID NO:80) 及びD2-13 (SEQ ID NO:83) プライマー (図16) を用いる犬cDNAのPCR増幅によって得た。次いで、PCR生成物をランダムプライミングにより<sup>32</sup>P標識した。20の陽性クローンをブランク精製し、ファージDNAを個々のクローンから抽出し、EcoRIで消化してpUC18中にサブクローン化した。挿入物の存在を、プラスミッドDNAのEcoRIでの消化により確認し、3つの個々のクローンのヌクレオチド配列を、シーケナーゼ (United States Biochemicals) 及びAmpliTaQサイクルシーケンシングキット (コネカット、Norwalk在、Perkin Elmer Cetus) を製造者の指示に従って用いて決定した。PCRサイクルシーケンシング分析は、恐らくGC

リッチなCanf IIテンプレート上の2次構造の形成の結果であろう幾つかのDNA配列の曖昧さを解決するための役に立った。配列決定のストラテジーを、図17に描いてある。配列決定/増幅に用いたプライマーは、New England BioLabsから市販されている16量体のReverse Sequencing Primer (-21) 及び17量体のSequencing Primer (-20) 並びに図16に列挙したCanf II特異的プライマーを含んだ。

これらの3つのクローンのヌクレオチド配列は、蛋白質配列決定及び部分的cDNAのPCR配列決定 (前記参照) により初期に同定された成熟Canf IIの38N末端アミノ酸残基 (図13におけるアミノ酸1~38) (SEQ ID NO:88) を含むオープンリーディングフレームの存在を示した。配列決定ストラテジー及び3つのcDNAクローン1a、1c及び1jの特徴を図17に示す。791bp (SEQ ID NO:67) のクローン1cは、Canf II前駆体蛋白質 (シグナル配列を含む) の全長をコードし及び5' (塩基1~194) 及び3' (塩基738~791) 非翻訳領域を含む。793bp (SEQ ID NO:69) のクローン1a及び774bp (SEQ ID NO:71) のクローン1jは、シグナル配列の部分が失われ、1cにおけるよりも長い3' 非翻訳領域を含む前駆体Canf II蛋白質をコードしている

。この配列の整列は、3つのクローン間の多形を示した(図18)。1aのヌクレオチド配列は、1cと比較して、1ヌクレオチド置

換(607位にてCからT)及び1欠失(752位)を含む(図18)。1jのヌクレオチド配列は、1a及び1cと比較して、2つのヌクレオチド置換を347位(TからC)及び401位(GからT)に含む。更に、クローン1a及び1cの配列は、それらの5'及び3'末端において有意に異なっている。401位におけるGからTへの置換は、Canf IIの予想アミノ酸配列を、残基68において、グリシン(GGC)からバリン(GTC)に変える。他のすべてのヌクレオチド変化は、それらがサイレント突然変異であるか又は成熟Canf IIのコード配列の外側にあるのでCanf IIのアミノ酸配列を変化させない。cDNAクローン間の多形は、異なる対立遺伝子からのCanf II伝子の発現を反映しているであろう。それは、誤りへと導き得る逆転写酵素によるcDNA合成の故のクローニングアーティファクトを表していることもあり得る(Holland等、(1982) Science, 215:1577-1585)。例えば、精製HIV-1逆転写酵素は、1/2000~1/4000の割合で取り込み誤りを導くことが見出された(Preston等、(1988) Science, 242:1168-1171)。GCリッチなCanf II mRNA上の2次構造形成が、逆転写の停止又は合成の異常終了を引き起こすこともあり得る。

図18に示したCanf II蛋白質の予想配列(SEQ ID NO:68)は、図18に示したcDNA (SEQ ID NO:67)の塩基195~251によりコードされる19アミ

ノ酸のシグナル配列を含んでいる。このシグナル配列は、塩基252~734によりコードされる成熟Canf II蛋白質中には見出されない。-19位のメチオニンコドンは、次の理由により、真の開始メチオニンコドンであり、内部メチオニン残基ではない: 1) シグナルペプチド(残基-19~-1)の予想アミノ酸配列がCanf IIに関連する蛋白質のシグナル配列に高度に類似しており且つ長さ等しいこと(下記参照); 及び2) 他のインフレームのメチオニンコドンが仮の開始メチオニン(-53位)の5'側に見出されるにもかかわらず、それが真の開始コドンであることはなさそうであること(何故なら、残基-53から開始す

るペプチドの演繹されたアミノ酸配列は、任意の既知のシグナル配列よりずっと長く且つ如何なる既知のシグナル配列とも何ら類似性を示さないから)。Canf I Ic DNAは、予想分子量18.2 kDa及び単一の潜在的N結合グリコシル化部位を有する蛋白質をコードする。1)蛋白質配列分析中に残基25にアミノ酸シグナルが見出されなかったこと、及び2)アスパラギン残基が、N結合グリコシル化のためのコンセンサス配列(N26 K27 S28)内にあることの故に、これらのデータは、N26残基がN結合グリコシル化により修飾されることを強く示唆する。Nグリコシル化は、成熟蛋白質の分子量を増加させ得る。この核酸配列によりコードされた成熟蛋白質の演繹されたアミノ酸配列は、実施例3に記載のよう

にして行なった精製Canf II蛋白質のアミノ酸配列分析により決定された既知のN2末端及び内部アミノ酸配列と同じである。

種々の組織におけるCanf II蛋白質の発現を、ノーザンブロット技術を用いて研究した。種々の組織からのポリ(A)RNA又は全RNAを、2.2Mホルムアミドを含む1.5%アガロースゲル中で電気泳動により分離した。(Ausubel等、前出)。電気泳動後に、分離したRNAをGeneScreenメンブレン(NEN)上にトランスファーした。トランスファー、<sup>32</sup>P標識したCanf IIプローブとのハイブリダイゼーション[該プローブは、D2-9 (SEQ ID NO:14)及びD2-13 (SEQ ID NO:83) (図16)プライマーを用いる、PCRによる増幅によって得た]及びフィルターの洗浄を、製造者の指示に従って行なった。Canf IIプローブは、高緊縮にて特異的に、犬耳下腺からのRNA及び舌上皮組織からのRNAとハイブリダイズすることが分かった(図20)。それは、肝臓又は下顎腺からのRNAとはハイブリダイズしなかった。ハイブリダイゼーションでは、約800bpと900bpの2つのバンドが認められ、これは、Canf IIが2種のmRNA種によってコードされていることを示唆している。サザンブロット実験は、犬ゲノム中に単一コピーのCanf II遺伝子しか存在しないことを示唆したので、2種のRNAが2つの異なる遺伝子から転写されるということはない。これらの2種の



Canf IIをコードする mRNA は、mRNA の別のスプライシング又は分解のためであろう。前者の可能性が非常にありそうである。何故なら、3' 非コード領域における異なるスプライシング構成が、Canf IIに類似の蛋白質について記載されているからである (Clark等、(1984) EMBO J., 3:1045-1052、下記も参照されたい)。

Canf IIの可能な生物学的機能を推論するために、そのアミノ酸配列をGenBank, GenBankUpdate, EMBL,及び EMBL Update配列データベースの配列と、NCBI BLASTネットワークサービスを利用して比較した (Altschul,S.F., 等、(1990) J. Mol.Biol., 215:403-410)。Canf II前駆体蛋白質は、次の2群の関連蛋白質と高度の類似性を示した: 1) マウス尿蛋白質 (MUP) (図21) (SEQ ID NO:90) 及び2) ラットの尿 a-2-グロブリン (A2U) (図21) (SEQ ID NO:89)。MUP 及び A2U の配列は、それらの両者がリポカリン蛋白質ファミリー (Cavaggioni等、(1987) FEBS Lett., 212:225-228) のメンバーであることを示している。これらは、疎水性分子に高度の親和性と特異性をもって結合し得る小型蛋白質である。このファミリーは、現在、配列相同性により基本的には一致する20の異なる蛋白質を含んでいる (Flower等、(1991) Biochem.Biophys.Res.Comm., 180:69-74)。MUP 及び A2U の機能は不明であるが、ゲッ歯類の尿蛋白質がフェロモン束縛及び引き続くそれらの乾燥尿からの放出の原因であることが提

案されている (Bocskai等、(1992) Nature, 360:186-188)。それらは、肝臓において種々のレベルで合成され且つ顎下腺、涙腺、耳下腺及び乳腺において合成される (Shahan等、(1987) Mol.Cell.Biol., 7:1947-1954)。例えば、MUP I V は、涙腺及び耳下腺において優勢に発現されるが、肝臓では発現されない (Shahan等、前出)。Canf II、MUP 及び A2U のアミノ酸類似性並びにそれらの発現パターンは、Canf IIが犬のリポカリン類似物であることを示し得る。興味深いことには、MUP 及び MUP 関連蛋白質の免疫学的及び生化学的研究は、これらの蛋白質が重要なヒトアレルギーであることを示している (Lorusso等、(1986) J.Allergy Clin.Immunol., 78:928; Platts-Mills等、(1987) J.Allergy C

lin.Immunol.,79:505; Gurka等、(1989) J.Allergy Clin. Immunol.,83:945-954)。

#### 実施例5：Canf Iの細菌での発現

Canf Iの細菌での発現を下記のようにして行なった。ベクター p E T 1 1 d Δ H R H i s 6 (ウイコンシ、Madison在、Novagen;ImmuLogic Pharmaceutical CorporationにてJ.P.Morgensternにより改変)を、このベクターに挿入すべきCanf I c D N Aからの内部 E c o R I 制限部位(残基 E 1 4 3 F 1 4 4)の除去によって、大腸菌におけるCanf Iの発現用に改変した。この改変は、このベクター中のすべてのD N A断片は、H i s 6のN H<sub>2</sub>末端リーダー配列と双方の5' E c o R I部位にてインフレーションでクローン化されるので必要であった。それ故に、挿入物内部のE c o R I部位は、回避しなければならない。p E T 1 1 d Δ H R H i s 6ベクターは又、挿入物が3' B a m H I部位を有することを必要とする。しかしながら、B g 1 I I及びB c 1 I等の制限部位は、B a m H Iオーバーハングと互換性があるので、それらは、Canf I c D N Aの3'末端に位置することが出来、内部B a m H I部位を突然変異させる必要性を回避する。成熟Canf I蛋白質をコードするc D N Aは、その除去された内部E c o R I部位、5'末端に位置する、ユニークなE c o R I部位及び3'末端に位置するB g .1 I I部位を、増幅中の誤りを最小にするためにP f u I D N Aポリメラーゼを用いる2ステップP C R反応(Ho等、前出)において有した(図6)。Canf I c D N Aの半分2つを第一次P C R反応

(テンプレート：サイクルシーケンシングからのP C R断片、プログラム：40×[95℃ 30秒/60℃ 45秒/75℃ 45秒])にて増幅し、この分子の5'部分をS t a r t e x (SEQ ID NO:46及びSEQ ID NO:47)/E Fアンチセンス(SEQ ID NO:50及びSEQ ID NO:48)プライマー対を用いて増幅し、3'部分をセンスE F (SEQ ID NO:49及びSEQ ID NO:48)/T A G B g 1 I I (SEQ ID NO:51及びSEQ ID NO:52)プライマー対を用いて増幅した。両E Fプライマーを、Canf Iの残基E 1 4 3 F 1 4 4のE c o R I部位に点突然変異(GAATTCから

GAGTTC)を導入するようにデザインした(これは、グルタミン酸がGAA又はGAGコドンによってコードされるので、E143残基を維持する)。

予想されるサイズの増幅されたDNA断片をゲルスライスにて0.6%低融点アガロースゲルから単離し、70℃にて融解させ、混合して第二次(2°)PCR反応にてテンプレートとして、Start ex及びTAGBg1IIプライマーと共に用いた。E143F144対を有する突然変異させた領域は、反応の初期ステージで、ハイブリダイズしてCanf Ic DNAの5'及び3'にリンクするが、他方、末端5'及び3'プライマーは完全な突然変異させたcDNAを増幅するのに役立つであろう。全反応を、フェノール/クロロホルム抽出し、EtOH沈殿させ、70%EtOHで洗い、そしてEcoRI及びBg1IIで消化した。予想される

サイズ(〜450bp)のバンドをゲルスライスとして0.6%低融点アガロースゲルから単離し、70℃で融解させ、室温でEcoRI/BamHI消化したpET11dΔHRHis6プラスミッドにライゲーションして、そのライゲーションしたものをXL-1細菌(Stratagene)中にトランスフォームした。トランスフォームしたコロニーの1つの3mlの培養物の、EcoRV消化によるミニプレップ分析(Qiagen[カリフォルニア州、Foster City在]プラスミッドミニキットを使用)は、発現ベクター中の適当なサイズの挿入物の存在を示した。このコロニーを接種した300mlの培養物を成長させ、プラスミッドDNAを抽出し(Qiagenプラスミッドmidiキット)そしてDNA配列分析にかけた。全453bp挿入物が、成熟Canf Ic DNAの正確な配列(GAAからGAGの突然変異したE143コドンを含む)を有し、5'末端にコードされたインフレームで付加されたHis6レポーター基(SEQ ID NO:53)を伴うことが示された。このHis6レポーター基は、組換え蛋白質の金属イオンアフィニティー精製にてNTANi<sup>++</sup>キレート樹脂(Qiagen;Hochuli等、前出)を用いて使用すべきものであった。

BL21(DE3)pET11dΔHRHis6Canf IdRI細菌の単一コロニーを2mlの脳心臓浸出液(BHI)培養(+200μg/mlアンピシリン)に接種して、飽和ではないが濃濁するまで37℃でイン

キュベートした。この時点で、 $6\mu\text{l}$ を取り出して $600\mu\text{l}$ のBHIに加えて混合した。 $100\mu\text{l}$ を6つのBHI間テンプレート(+ $200\mu\text{g}$ アンピシリン)の各々に広げて一晩 $37^\circ\text{C}$ でインキュベートした。翌朝、細菌の芝生をプレートから掻き取ってプールして $20\text{ml}$ のBHI培地中に再懸濁し、次いで、 $1\text{ml}$ のアリコートを取って、18個の2リットルEhrlenmeyerフラスコ中の各 $500\text{ml}$ のBHI培養物(+ $200\mu\text{g}/\text{ml}$ アンピシリン)に加えた。培養物を $37^\circ\text{C}$ でインキュベートし、 $A_{600}$ が1.0に達するまで $300\text{rpm}$ で振盪した。次いで、イソプロピル- $\beta$ -D-チオガラクトピラノシド(IPTG)を、終濃度 $1\text{mM}$ まで加えてT7RNAポリメラーゼ遺伝子の発現を誘導した(これは、更に、ハイブリッドT7  $g_{n10}/lacO$ プロモーターからのHis6 Canf I蛋白質の発現を誘導する)。発現を2時間進行させ、その後細菌をペレット化して $6\text{M}$ グアニジンヒドロクロリド( $\text{GuHCl}$ )、 $100\text{mM}$   $\text{NaPO}_4$ 、 $10\text{mM}$ トリス、 $100\text{mM}$  2-メルカプトエタノール( $\text{pH} 8.0$ )中に再懸濁した。抽出を1時間激しく振盪しながら行ない、不溶性物質を $10\text{Krpm}$ でJA-10ローター(Beckman)にて1時間でペレット化することにより停止した。上清を取り出し、その $\text{pH}$ を $8.0$ に調節してから、 $6\text{M}$   $\text{GuHCl}$ 、 $100\text{mM}$   $\text{NaPO}_4$ 、 $10\text{mM}$ トリス( $\text{pH} 8.0$ )にて平衡化した $50\text{ml}$

のNTAアガロースカラム上に載せた。カラムを、次のように、ステップ勾配により洗った：1)  $6\text{M}$   $\text{GuHCl}$ 、 $100\text{mM}$   $\text{NaPO}_4$ 、 $10\text{mM}$ トリス( $\text{pH} 8.0$ )、2)  $8\text{M}$  尿素、 $100\text{mM}$   $\text{NaPO}_4$ 、 $10\text{mM}$ トリス( $\text{pH} 8.0$ )、3)  $8\text{M}$  尿素、 $100\text{mM}$   $\text{NaOAc}$ 、 $10\text{mM}$ トリス( $\text{pH} 6.3$ ) (各洗浄処理を、カラムからの流出液の $A_{280}$ がバックグラウンドに達するまで行なった)。組換えHis6 Canf I蛋白質は、 $8\text{M}$  尿素、 $100\text{mM}$   $\text{NaOAc}$ 、 $10\text{mM}$ トリス( $\text{pH} 4.5$ )にてカラムから溶出された。プールしたピーク画分の収量は、 $\sim 100\text{mg}$ であり、SDS-PAGEにより分析した物質試料の密度測定により測定して $\sim 80\%$ の純度であった。

Canf Iをコードする核酸を含むベクターpET11dでトランスフォームした

大腸菌を、ATCCに、受託番号69167にて寄託した。

#### 実施例6：Canf I蛋白質の哺乳動物での発現

哺乳動物細胞内で発現される可能なグリコシル化した形態の組換えCanf I蛋白質を生成するために、Canf Iの発現を下記のように行なった。完全長のCanf I蛋白質（成熟蛋白質中には見出されないリーダー配列を含む）は、哺乳動物細胞内で発現させた場合、適当に折りたたまれ、グリコシル化されて分泌される。組換えCanf Iの高レベルの一過性発現のための2つの系を用いた。第1

に、COOH末端に融合したHis6レポーター基を有する組換えCanf Iの一過性発現を、NIH3T3細胞において、pJ7 $\Omega$ 発現ベクター（Morgenstern, J. P. 及び Land, H., (1990) Nuc. Acids Res., 18:1068）を用いて行なった。pJ7 $\Omega$ は、ポリリンカー中に挿入された遺伝子の発現を、一過性トランスフェクト中に、SCMVIE94プロモーター（Morgenstern 及び Land, 前出）から、高レベルに駆動する。

全Canf Iコード配列を含むcDNAを、5' Kozakリーダー（SEQ ID NO:54）／3' TAGBg1II（SEQ ID NO:51及びSEQ ID NO:52）プライマー対（図7参照）を伴う全犬耳下腺cDNAの、PfuIによるPCRを用いて増幅した。全PCR反応をフェノールクロロホルム抽出し、EtOH沈殿させ、70% EtOHで洗い、そして、XhoI及びBg1IIで消化してpJ7 $\Omega$ への挿入のための正確なオーバーハングを生成した。全Canf IcDNAをコードするために予想されるサイズ（～600bp）のバンドを、ゲルスライスとして、0.6% 低融点アガロースゲル上で単離し、70℃で融解して、SalI／Bg1II消化したpJ7 $\Omega$ に室温でライゲーションした（図7参照）。このライゲーションしたものをコンピtentなXL-1 Blue大腸菌中にトランスフォームして、陽性コロニーをアンピシリン（200 $\mu$ g/ml）皿上で選択した。挿入物の5' 及び3' 末端のDNA配列分析を、2つのコロニーの3

mlの培養物から得たプラスミッド上で行った（Qiagenプラスミッドminiキットを使用）。両プラスミッドは、完全長のCanf Iの5' 及び3' 末端の正確な配列

を有する挿入物を有した。

次に、哺乳動物細胞中で生成された組換えCanf I蛋白質の精製を助成するために (Jankecht, R. 等、(1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:8972-8976)、H i s 6 レポーター基は、C O O H 末端に融合されるべきものであった。これを、Ca n f IのC O O H 末端をコードするDNA断片をE c o R I - B g 1 I I 断片として切り出し、それを更なる6ヒスチジンで改変した蛋白質のC O O H 末端をコードするE c o R I - B g 1 I I 断片と交換することにより達成した (図8)。このC O O H 末端 H i s 6 DNA断片を、次のような重複する合成オリゴヌクレオチドのPCRにより生成した：成熟Canf I蛋白質の残基 E 1 2 3 ~ Q 1 4 8 (SEQ ID NO:55) をコードするセンスオリゴヌクレオチド (SEQ ID NO:56)；センス 3' H i s 6 リンク (SEQ ID NO:57)；残基 E 1 4 1 ~ Q 1 4 8 / H i s 6 域 / 停止コドン (SEQ ID NO:50及びSEQ ID NO:59) をコードするアンチセンスオリゴヌクレオチド；及び 3' H i s 6 T A G B g 1 I I (SEQ ID NO:60) を合成してOPCカラムクロマトグラフィー (カラム7、Foster City在、Applied Biosystems) により精製した。更に、上記のオリゴヌクレオチドの最初の24ヌクレオチドからなる一層小さいプライマーである

5' H i s 6 リンク及び3' H i s リンクをも合成した。PCRによって、これらの2つの長いオリゴヌクレオチドを結合し且つ増幅して、Canf I C O O H 末端 - H i s 6 融合物をコードするE c o R I - B g 1 I I DNA断片を生成した。それぞれの大型オリゴヌクレオチド10 pモルを、プログラム40× (95℃ 30秒 / 60℃ 45秒 / 75℃ 30秒) を使用し1 μMプライマーを用いるPfu IによるPCRにおいて基質として用いた。全PCR反応をフェノール抽出し、EtOH沈殿させ、70% EtOH洗浄し、E c o R I 及びB g 1 I I で消化してpJ7Ωへの挿入のための正確なオーバーハングを生成した。Canf I C O O H 末端 / H i s 6 融合物をコードするための予想されるサイズ (~110 bp) のバンドを2.0% NuSieveアガロースゲル上のゲルスライスとして単離し、70℃で融解させてE c o R I / B g 1 I I 消化したpJ7Ω Canf Iに室温でライゲーションした。このライゲーションしたものをコンピテントなXL-1 Blue

大腸菌にトランスフォームして陽性クローンをアンピシリン ( $200 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) 皿にて選択した。プラスミッドを、異なるコロニーを接種した4つの培養から単離して挿入物の3'末端におけるDNA配列分析にかけた。クローン#3は、Canf IのCOOH末端にインフレームで結合した予想されたHis6残基を含んでおり、それ故、この培養物の大規模生育に取りかかってトランスフェクション用に多

量のpJ7 $\Omega$ Canf IH i s 6プラスミッドを得た。A<sub>600</sub>が0.6に到達したら、1リットルの培養物を $15 \mu\text{M}$ クロラムフェニコール中で増幅させた。 $800 \mu\text{g}$ のプラスミッドを、アルカリ溶解及び2回の連続したCsClバンド化 (Sambrook等、前出) の後に単離した。

NIH3T3細胞の10プレートを、 $1.7 \times 10^6$ 細胞/ $15 \text{ cm}$ 組織培養皿でまき、次の朝、 $20 \mu\text{g}/\text{皿}$ のpJ7 $\Omega$ Canf IH i s 6プラスミッド (Parker, B.A., 及びStark, G.R., (1979) J. Virol., 31:360-369) でのリン酸カルシウムトランスフェクトに供した。トランスフェクションの48時間後に、これらの皿から上清をブールし、 $0.45 \mu$ ユニット (Costar) を通して濾過し、そして、 $1 \mu\text{M}$ イミダゾール濃度とした (プロテアーゼインヒビター  $1 \text{ mM}$  PMSF、 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$  ペプスタチン、 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$  大豆トリプシンインヒビター及び $1 \mu\text{g}/\text{ml}$  ロイペプチンを添加)。その上清を、 $1 \times \text{PBS}$ 、 $1 \text{ mM}$  イミダゾール、 $1 \text{ mM}$  PMSF、 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$  ペプスタチン、 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$  大豆トリプシンインヒビター及び $1 \mu\text{g}/\text{ml}$  ロイペプチンにて平衡化した $2 \text{ ml}$  NTAアガロース (Qiagen) カラムに加えることにより、Canf IH i s 6蛋白質の金属イオンアフィニティー精製を達成した。非特異的に結合した蛋白質を、 $10$  カラム容積の  $1 \times \text{PBS}$ 、 $20 \text{ mM}$  イミダゾール、 $1 \text{ mM}$  PMSF、 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$  ペプスタチン、

$1 \mu\text{g}/\text{ml}$  大豆トリプシンインヒビター及び $1 \mu\text{g}/\text{ml}$  ロイペプチンでカラムから洗い出した。Canf IH i s 6蛋白質は、 $1 \times \text{PBS}$ 、 $80 \text{ mM}$  イミダゾール、 $1 \text{ mM}$  PMSF、 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$  ペプスタチン、 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$  大豆トリプシ

ンインヒビター及び  $1 \mu\text{g}/\text{ml}$  ロイペプチン (Hoffmann, A. 及び Roeder, R.G., (1991) Nuc. Acids, Res., 19:6337-6338 及び Janknecht 等、前出) にて、特異的にカラムから溶出された。溶出した画分のアリコートを  $12\%$  SDS PAGE によって分析した。ゲルのクーマシーブルー染色は、分子量  $\sim 70 \text{ kDa}$ 、 $45 \text{ kDa}$  及び  $25 \text{ kDa}$  の3つの主要バンドを示した。天然のイムノアフィニティー精製した Canf I の分子量は  $25 \text{ kDa}$  である (Schou 等、及び Groot 等、前出) ので、この SDS ゲル上の最小のバンドが組換え Canf I His 6 であることが推測される。

#### 実施例 7 : E L I S A 及びウエスタンブロットによる

##### 組換え Canf I に対するヒト I g E の直接結合

E L I S A プレート (IMMULON II、 $\text{--}$ ニ7、Chantilly 在、Dynatech) を、細菌で発現させた組換え Canf I (rCanf I) で  $0.5 \mu\text{g}/\text{well}$  (PBS-Tween 中) にて被覆し、 $4^\circ\text{C}$  で一晚インキュベートした。被覆抗原を取り出し、ウェルを PBS 中の  $0.5\%$  ゼラチン ( $200 \mu\text{l}/\text{well}$ ) で2時間室温でブロックした。皮膚試験陽性の犬アレルギー患者 # 901 からの血漿を、PBS-Tween で連続的に希釈して、ウェル当り

$100 \mu\text{l}$  を加えて一晚  $4^\circ\text{C}$  でインキュベートした (これらの血漿の希釈物は二連で試験した)。第2抗体 (ビオチン化ヤギ抗-ヒト I g E  $1:1000$ 、Kirkegaard & Perry Laboratories) を、 $100 \mu\text{l}/\text{well}$  で1時間室温で加えた。この溶液を取り出し、ストレプトアビジン-HRP O を  $1:10,000$  (7ラ7、Birmingham 在、Southern Biotechnology Associates) で1時間室温で加えた。TMB メンブレンペルオキシダーゼサブストレートシステム (Kirkegaard & Perry Laboratories) を新たに混合して  $100 \mu\text{l}$  にて加えた。2~5 分間発色させた。この反応を、 $100 \mu\text{l}/\text{well}$  での  $1 \text{ M}$  リン酸の添加により停止させた。このプレートを、Microplate EL 310 オートリーダー ( $\text{--}$ モト、Winooski 在、Biotek Instruments) で  $450 \text{ nm}$  フィルターを用いて読んだ。二連のウェルの吸光度レベルを平均した。そのグラフ化した結果を、図 11 に示す。このデータは、患者 # 901 が、 $1/162$  希釈 (用いた最大血漿希釈物) にて、組換え



Canf Iに対する結合レベルがやはりバックグラウンドの2倍である程に高レベルの抗Canf特異的 I g Eを有することを示している。公知の陰性患者（#250）は、このアッセイによって陰性であることも試験して示された。

Canf Iの潜在的源として4つの異なる蛋白質調製物のウエスタンブロットを行った。ウエスタンブロッティングに用いた4つの異なる調製物は：犬の毛の抽出物、

犬の唾液、細菌で発現させたrCanf I（E L I S Aに使用）及び哺乳動物細胞培養システムにて発現させたrCanf Iであった。これらの調製物を15%アクリルアミドSDS-PAGEに5  $\mu$ g/レーンで載せた（それぞれ、1～4レーン）。蛋白質濃度は、ビシンコニン酸（Bicinchoninic acid）（BCA）アッセイ

（イノイ、Rockford在、Pierce）に基づいた。電気泳動後に、これらの蛋白質をニトロセルロースにトランスファーして、墨汁で染色した。ニトロセルロース切片を、1%ミルク/1%BSAを含むTween溶液中で30分間室温でインキュベートすることによりブロックし、次いで、患者#901血漿又は陰性対照患者#250をプローブとして、Tween緩溶液中で1:20希釈にて調べた。この第一次抗体インキュベーションを一晚室温で行なった。ビオチン化ヤギ抗ヒトI g E（K P L）を第2次抗体として用いて1:5000希釈にて2時間インキュベートした。ストレプトアビジン-HRP O（1:20, 000希釈）及びE C L ウエスタンブロット検出システム（イノイ、Arlington Heights在、Amersham）を、化学発光による検出のために用いた。20秒露出を行なって、フィルムを現像した。このアッセイの結果は、患者#250のI g Eによっては蛋白質調製物の認識がされないことを示している。犬アレルギー患者#901からのI g Eは、唾液中のCanf I蛋白質及び細菌で発現させた組換えCanf Iへの明瞭な結合（図12、レーン2及び

3）を示している。これらの蛋白質型のサイズは、これらの2つの調製物間で異なっているが、これは、犬の唾液中に見出される天然Canf I蛋白質がグリコシル化されて見かけ分子量28,000で泳動されるのに対して、細菌からの組換え

型は炭水化物修飾を有していないという事実のためである。患者#901の血清からのIgEの哺乳動物で発現されたrCanf Iへの結合は極めてかすかであり、目下のところ、陽性発現を示唆するのみである。完全長の細菌にて産生した型（レーン3）は、見かけ分子量18,000ダルトンを有し、レーン2及び3の両方の一層大きいIgE結合蛋白質は、恐らくもっと小さい分子量の蛋白質の2量体構造であろう。

#### 実施例8：Canf IIの細菌での発現

多量の純粋な組換えCanf II蛋白質を容易に製造する試みにおいて、成熟Canf II蛋白質をコードする完全長cDNAを、D2-3 pet (SEQ ID NO:103) 及びD2-5 pet (SEQ ID NO:104) プライマー対（図13）を用いるPCRにおいて、全耳下腺cDNAからの分子の増幅により得た。プライマーを、EcoRI及びBamHI制限部位をそれぞれcDNA分子の5'及び3'に導入するようにデザインした。pET11dΔHRHis6ベクターは、挿入物が5'EcoRI部位及び3'BamHI部位を有することを必要とする。

予想サイズの増幅したDNA断片を、低融点アガロー

ス中で電気泳動により精製して、室温でEcoRI/BamHI消化したpET11dΔHRHis6プラスミッドにライゲーションし、そのライゲーション混合物を用いてXL-1 Blue細菌 (Stratagene) をトランスフォームした。幾つかのトランスフォームしたコロニーのミニプレップ分析 (Qiagen [カリフォルニア、Foster City在] miniキットを使用) は、発現ベクター中の適当なサイズの挿入物の存在を示した。1コロニーを接種した300mlの培養物を生育させ、プラスミッドDNAを抽出して配列分析にかけた。完全な486bpの挿入物は、5'末端にコードされたレポーター基を付加された成熟Canf II cDNAに対する正確な配列を有することが示された。このHis6レポーター基は、組換え蛋白質のNTA Ni<sup>++</sup>キレート樹脂 (Qiagen) を使用する金属イオンアフィニティー精製において用いるべきものであった。BL21 (DE3) pET11dΔHRHis6 Canf II細菌の単一コロニーを、2mlの脳心臓浸出液 (BHI) 培養 (+200 µg/ml アンピシリン) 中に接種して、飽和ではないが濃濁となるまで3

7℃でインキュベートした。この時点で、6  $\mu$  l を取り出して、600  $\mu$  l の BHI に加えて混合した。6 個の各 BHI 寒天プレート (+200  $\mu$  g アンピシリン) 上に100  $\mu$  l を広げて一晚37℃でインキュベートした。次の朝、細菌の芝生をプレートから掻き取ってプールし、20 ml の BHI 培地に再懸濁し、次いで、1 ml のア

リコートを取って、18 個の2リットルEhrlenmeyerフラスコ中の各500 ml の BHI 培養物 (+200  $\mu$  g / ml アンピシリン) に加えた。培養物を37℃でインキュベートし、A<sub>600</sub>が1.0に達するまで300 r p m で震盪した。次いで、イソプロピル- $\beta$ -D-チオガラクトピラノシド (IPTG) を、1 mM まで加えて T7 RNA ポリメラーゼ遺伝子の発現を誘導した (これは、更に、ハイブリッド T7 g n 1 0 / l a c 0 プロモーターからの H i s 6 Canf II 蛋白質の発現を誘導する)。

発現を2時間進行させ、その後細菌をペレット化して6Mグアニジンヒドロクロリド (GuHCl)、100 mM NaPO<sub>4</sub> 10 mM トリス、100 mM

2-メルカプトエタノール (pH 8.0) 中に再懸濁した。抽出を1時間激しく振盪しながら行ない、不溶性物質を10 K r p m で J A - 1 0 ローター (Beckman) にて1時間でペレット化することにより停止した。上清を取り出し、その pH を8.0に調節してから、6M GuHCl、100 mM NaPO<sub>4</sub>、10 mM トリス (pH 8.0) にて平衡化した50 ml の NTA アガロースカラム上に載せた。カラムを、次のように、ステップ勾配により洗った: 1) 6M GuHCl、100 mM NaPO<sub>4</sub>、10 mM トリス (pH 8.0)、2) 8M 尿素、100 mM NaPO<sub>4</sub>、10 mM トリス (pH 8.0)、3) 8M 尿素、100 mM N a

OAc、10 mM トリス (pH 6.3) (各洗浄処理を、カラムからの流出液の A<sub>280</sub> がバックグラウンドに達するまで行なった)。組換え H i s 6 Canf I 蛋白質は、8M 尿素、100 mM NaOAc、10 mM トリス (pH 4.5) にてカラムから溶出された。プールしたピーク画分の収量は、~100 mg であり、

S D S - P A G E により分析した物質試料の密度測定により測定して～80%の純度であった。

Canf IIをコードする核酸を含むベクター p E T 1 1 d でトランスフォームした大腸菌を、A T C C に、受託番号 X X X にて寄託した。

#### 実施例 9 : ヒト I g E の天然及び組換えCanf IIへの

##### 直接結合

14人の犬アレルギー患者（皮膚試験4+）からの血漿試料を、天然Canf II及びrCanf IIに結合するI g Eについてアッセイした。E L I S A プレート（Immulon II、-ニア、Chantilly在、Dynatech）を、天然の及び細菌で発現させた組換えCanf IIで0.5 μg / ウェル（P B S - Tween中）にて被覆し、4℃で一晩インキュベートした。被覆抗原を取り出し、ウェルをP B S 中の0.5%ゼラチン（200 μl / ウェル）で2時間室温でブロックした。ヒトI g Eの被覆抗原への結合を、ビオチン化ヤギ抗ヒトI g E、ペルオキシダーゼに結合したストレプトアビジン及びT M B 基質を用いて検出し

た。反応物を、プレートリーダーで、450 nm（A450）にて読んだ。天然Canf IIに対するI g Eについて試験した14の血漿試料の内、5つが検出可能な抗体結合を含んだ（最高レベルを含む患者#901及び#227からの血漿を使用）（図22A）。同様に、細菌で発現させた組換えCanf IIに対するI g Eについて試験した23の血漿試料の内、幾つかは、検出可能な抗体結合を含んだ（図22B及びC）。

#### 実施例 10 : Canf I ヒト T 細胞増殖分析

Canf I T 細胞刺激活性を有するペプチドを同定するために、Canf Iから誘導した幾つかのペプチドを生成して、組換えCanf I蛋白質でプライムしたヒト T 細胞系統と共に培養し、標準的 T 細胞増殖アッセイによって応答を測定した。増殖アッセイにおいて、Canf I（Construct 1（SEQ ID NO:105）、Construct 2（SEQ ID NO:106）及びConstruct 3（SEQ ID NO:107））から導いたペプチドのセット（それぞれは、Canf I蛋白質の一部に相当する）を用いた。更に、これらのアッセイは、Hill等、Journal of Immunology147:184-197に記載されたアルゴリズム

を用いて潜在的T細胞エピトープを含んでいるので選択した2つのペプチド（アミノ酸7～19のA0095（SEQ ID NO:108）及びアミノ酸42～54の（SEQ ID NO:109））を含んだ。

Construct1、2及び3を、Canf I蛋白質を標準技術を用いて大腸菌中で発現させ、そして精製することによって生成した。Construct1（Canf Iのアミノ酸1～65）及びConstruct2（アミノ酸56～108）をコードするDNA断片を、完全長のCanf Ic DNAを含むプラスミッドpET11dΔHRHis6Canf IΔから増幅することによって獲得し、His6レポーター配列を含むpET11dベクターのEcoRI/BamHI部位中にサブクローン化した。Construct3（アミノ酸90～148）をコードするDNA断片を同じプラスミッドから増幅してpET11dベクターのEcoRI部位にサブクローン化した。組換え蛋白質を、NTANi++キレート樹脂（Qiagen）にて、公開されたプロトコールに従ってアフィニティー精製した。

Canf I及び上記の5つのCanf Iペプチドに対するヒトT細胞増殖応答のイン・ビトロアッセイを行なうために、皮膚ブリック試験においてCanf Iに対してアレルギー性の患者から得た全血液を、リンパ球分離用培地（LSM）を通して血小板、赤血球及び顆粒球を除去した。その結果の末梢血液単核細胞（PBMC）を、5%熱不活性化ヒトAB血清、2mM レーグルタミン、10mM HEPES、50μM 2-メルカプトエタノール並びに100U/mlのペニシリン及びストレプトマイシンを補ったRPMI 1640培地中で、実施例2に記載したようにして生成した50μg/mlの組換え

Canf Iで6日間刺激した。

第2のLSM分離を行なって高密度の細胞残骸及び死細胞を除去した。その結果のPBMC細胞を12～18日間増殖させた。この期間中、培地に組換えIL2（5単位/ml）及びIL4（5単位/ml）を補った。

リンパ球が休止点に到達したときに（<sup>3</sup>Hチミジンによる20,000細胞の一晩のパルス標識が2000～4000CPMの範囲になったことで判定）、こ

これらの細胞を第2増殖アッセイにおける分析のために再刺激した。第2 T細胞増殖アッセイは、 $2 \times 10^4$  T細胞/ウェル、抗原提示細胞としての $5 \times 10^4$  PBMC/ウェル（3500ラドで照射）を含んだ。抗原を二重若しくは三重ウェルにて下記の濃度でアッセイした：

rCanf I : 4、40及び100  $\mu\text{g}/\text{ml}$

ペプチド : 3、15及び75  $\mu\text{g}/\text{ml}$

犬抽出物 : 3、15及び75  $\mu\text{g}$  蛋白質/ $\text{ml}$    こ

の調製物犬抽出物中のCanf Iの濃度は未知である

Construct : 初期に20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ の単一濃度で、

その後3、15及び75  $\mu\text{g}/\text{ml}$

Constructは、75  $\mu\text{g}/\text{ml}$ で不溶性であった。

PHAを1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ で加えて非特異的活性化能力を誘導した。無関係の抗原である破傷風毒素を1:2000、1:4000及び1:8000の希釈で加えてT細胞特異性を示した。

第2アッセイの条件下での培養の3日後に、1  $\mu\text{Ci}$ の $^3\text{H}$ チミジンを各培養ウェルに加えて一晩インキュベートした。培養物をガラスフィルター上に採取して $^3\text{H}$ チミジンの取り込みを $\beta$ シンチレーション計数により測定した。ペプチドに対するT細胞応答の強さの尺度である刺激インデックスを、処理した培養物の $^3\text{H}$ チミジン取り込みを未処理の培地対照の $^3\text{H}$ チミジン取り込みで割ることによって計算した。

第2 T細胞増殖アッセイの結果を、図24～25に示す。図24は、rCanf I、ペプチドA0095～A0096及びConstruct1～3に対する個々の患者の刺激インデックスをグラフにより比較している。この比較は、Construct1～3（これらは、集まると完全なCanf I蛋白質配列を含む）の相当な刺激インデックスによって示されるように、Canf I蛋白質におけるT細胞反応性の重要な領域がこの蛋白質の3つのすべての部分に見出されることを示している。

図10に示したペプチドについてのポジティブイターインデックスを、平均T細胞刺激インデックス（図25）に試験した個人の内で陽性応答即ち少なくとも

2のT細胞刺激インデックスを有した者のパーセントを乗ずることによって計算した。各試験したペプチドについての陽性応答者のパーセンテージは次の通りであった：rCanf I：89%、A0095：43%、A0096：43%、Construct1：64%、Construct2：73

%、Construct3：82%。犬鱗屑アレルギーに感受性の個人の集団において、ペプチドに対するT細胞応答の強さ（S.I.）及びペプチドに対するT細胞応答の頻度の両者を計るポジティブィーインデックスの比較（図10）は、Canf I蛋白質のN末端（アミノ酸1～65）とC末端（アミノ酸90～108）の両末端が多くのT細胞エピトープを含むことを示す。

#### 同等物

この発明は、好適具体例に関して記載されているが、他の具体例も同じ結果に到達し得る。当業者は、常例的実験を用いて、ここに記載した特定の具体例の多くの同等物を認識し又は確かめることが出来る。かかる同等物もこの発明の範囲内にあると考えられ、後述の請求の範囲に含まれる。

## SEQUENCE LISTING

## (1) GENERAL INFORMATION:

## (i) APPLICANT:

(A) NAME: IMMULOGIC PHARMACEUTICAL CORPORATION  
(B) STREET: 610 Lincoln Street  
(C) CITY: Waltham  
(D) STATE: MA  
(E) COUNTRY: USA  
(F) POSTAL CODE (ZIP): 02154  
(G) TELEPHONE: (617) 466-6000  
(H) TELEFAX: (617) 466-6040

(ii) TITLE OF INVENTION: Allergenic Protein and Peptides from Dog  
Dander and Uses Therefor

(iii) NUMBER OF SEQUENCES: 109

## (iv) COMPUTER READABLE FORM:

(A) MEDIUM TYPE: Floppy disk  
(B) COMPUTER: IBM PC compatible  
(C) OPERATING SYSTEM: PC-DOS/MS-DOS  
(D) SOFTWARE: ASCII Text

## (v) CURRENT APPLICATION DATA:

(A) APPLICATION NUMBER:  
(B) FILING DATE:

## (vi) PRIOR APPLICATION DATA:

(A) APPLICATION NUMBER: US08/156,549  
(B) FILING DATE: 22-Nov-93  
(A) APPLICATION NUMBER: US07/999,712  
(B) FILING DATE: 31-Dec-92

## (viii) ATTORNEY/AGENT INFORMATION:

(A) NAME: Mandragouras, Amy E.  
(B) REGISTRATION NUMBER: 36,207  
(C) REFERENCE/DOCKET NUMBER: IMI-026CPPC

## (ix) TELECOMMUNICATION INFORMATION:

(A) TELEPHONE: (617) 227-7400  
(B) TELEFAX: (617) 227-5941

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:1:

## (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 525 base pairs  
(B) TYPE: nucleic acid  
(C) STRANDEDNESS: single  
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA



## (ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: CDS

(B) LOCATION: 1..525

## (ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: mat\_peptide

(B) LOCATION: 79..525

## (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:1:

ATG AAG ACC CTG CTC CTC ACC ATC GGC TTC AGC CTC ATT GCG ATC CTG	48
Met Lys Thr Leu Leu Leu Thr Ile Gly Phe Ser Leu Ile Ala Ile Leu	
-26 -25 -20 -15	
CAG GCC CAG GAT ACC CCA GCC TTG GGA AAG GAC ACT GTG GCT GTG TCA	96
Gln Ala Gln Asp Thr Pro Ala Leu Gly Lys Asp Thr Val Ala Val Ser	
-10 -5 1 5	
GGG AAA TGG TAT CTG AAG GCC ATG ACA GCA GAC CAG GAG GTG CCT GAG	144
Gly Lys Trp Tyr Leu Lys Ala Met Thr Ala Asp Gln Glu Val Pro Glu	
10 15 20	
AAG CCT GAC TCA GTG ACT CCC ATG ATC CTC AAA GCC CAG AAG GGG GGC	192
Lys Pro Asp Ser Val Thr Pro Met Ile Leu Lys Ala Gln Lys Gly Gly	
25 30 35	
AAC CTG GAA GCC AAG ATC ACC ATG CTG ACA AAT GGT CAG TGC CAG AAC	240
Asn Leu Glu Ala Lys Ile Thr Met Leu Thr Asn Gly Gln Cys Gln Asn	
40 45 50	
ATC ACG GTG GTC CTG CAC AAA ACC TCT GAG CCT GGC AAA TAC ACG GCA	288
Ile Thr Val Val Leu His Lys Thr Ser Glu Pro Gly Lys Tyr Thr Ala	
55 60 65 70	
TAC GAG GGC CAG CGT GTC GTG TTC ATC CAG CCG TCC CCG GTG AGG GAC	336
Tyr Glu Gly Gln Arg Val Val Phe Ile Gln Pro Ser Pro Val Arg Asp	
75 80 85	
CAC TAC ATT CTC TAC TGC GAG GGC GAG CTC CAT GGG AGG CAG ATC CGA	384
His Tyr Ile Leu Tyr Cys Glu Gly Glu Leu His Gly Arg Gln Ile Arg	
90 95 100	
ATG GCC AAG CTT CTG GGA AGG GAT CCT GAG CAG AGC CAA GAG GCC TTG	432
Met Ala Lys Leu Leu Gly Arg Asp Pro Glu Gln Ser Gln Glu Ala Leu	
105 110 115	
GAG GAT TTT CGG GAA TTC TCA AGA GCC AAA GGA TTG AAC CAG GAG ATT	480
Glu Asp Phe Arg Glu Phe Ser Arg Ala Lys Gly Leu Asn Gln Glu Ile	
120 125 130	
TTG GAA CTC GCG CAG AGC GAA ACC TGC TCT CCA GGA GGA CAG TAG	525
Leu Glu Leu Ala Gln Ser Glu Thr Cys Ser Pro Gly Gly Gln	
135 140 145	

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:2:

## (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 174 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (D) TOPOLOGY: linear

## (ii) MOLECULE TYPE: protein

## (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:2:

```

Met Lys Thr Leu Leu Leu Thr Ile Gly Phe Ser Leu Ile Ala Ile Leu
-26 -25                      -20                      -15

Gln Ala Gln Asp Thr Pro Ala Leu Gly Lys Asp Thr Val Ala Val Ser
-10                      -5                      1                      5

Gly Lys Trp Tyr Leu Lys Ala Met Thr Ala Asp Gln Glu Val Pro Glu
10                      15                      20

Lys Pro Asp Ser Val Thr Pro Met Ile Leu Lys Ala Gln Lys Gly Gly
25                      30                      35

Asn Leu Glu Ala Lys Ile Thr Met Leu Thr Asn Gly Gln Cys Gln Asn
40                      45                      50

Ile Thr Val Val Leu His Lys Thr Ser Glu Pro Gly Lys Tyr Thr Ala
55                      60                      65                      70

Tyr Glu Gly Gln Arg Val Val Phe Ile Gln Pro Ser Pro Val Arg Asp
75                      80                      85

His Tyr Ile Leu Tyr Cys Glu Gly Glu Leu His Gly Arg Gln Ile Arg
90                      95                      100

Met Ala Lys Leu Leu Gly Arg Asp Pro Glu Gln Ser Gln Glu Ala Leu
105                      110                      115

Glu Asp Phe Arg Glu Phe Ser Arg Ala Lys Gly Leu Asn Gln Glu Ile
120                      125                      130

Leu Glu Leu Ala Gln Ser Glu Thr Cys Ser Pro Gly Gly Gln
135                      140                      145

```

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:3:

## (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 7 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (D) TOPOLOGY: linear

## (ii) MOLECULE TYPE: peptide

## (v) FRAGMENT TYPE: internal

BEST AVAILABLE COPY

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:3:

Trp Tyr Leu Lys Ala Met Thr  
1 5

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:4:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
(A) LENGTH: 25 base pairs  
(B) TYPE: nucleic acid  
(C) STRANDEDNESS: single  
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:4:

GGGAATTCTG GTATTTRGCN ATGAC

25

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:5:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
(A) LENGTH: 28 base pairs  
(B) TYPE: nucleic acid  
(C) STRANDEDNESS: single  
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:5:

GGGAATTCTG GTAYCTNAAR GCNATGAC

28

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:6:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
(A) LENGTH: 8 amino acids  
(B) TYPE: amino acid  
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(v) FRAGMENT TYPE: internal

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:6:

Asp Gln Glu Val Pro Glu Lys Pro  
1 5

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:7:

- (1) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
  - (A) LENGTH: 23 base pairs
  - (B) TYPE: nucleic acid
  - (C) STRANDEDNESS: single
  - (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:7:

GAYCARGARG TNCCDGARAA RCC

23

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:8:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
  - (A) LENGTH: 7 amino acids
  - (B) TYPE: amino acid
  - (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(v) FRAGMENT TYPE: internal

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:8:

Tyr Ile Leu Tyr Cys Glu Gly  
1 5

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:9:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
  - (A) LENGTH: 20 base pairs
  - (B) TYPE: nucleic acid
  - (C) STRANDEDNESS: single
  - (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:9:

TACATTCTNT AYTGTGARGG

20

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:10:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
  - (A) LENGTH: 8 amino acids
  - (B) TYPE: amino acid
  - (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(v) FRAGMENT TYPE: internal

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:10:

Met Ile Leu Lys Ala Gln Lys Gly  
1 5

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:11:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
(A) LENGTH: 29 base pairs  
(B) TYPE: nucleic acid  
(C) STRANDEDNESS: single  
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:11:

GGGGATCCYT TYTGNGCYTT YAADATCAT

29

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:12:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
(A) LENGTH: 29 base pairs  
(B) TYPE: nucleic acid  
(C) STRANDEDNESS: single  
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(iv) ANTISENSE: yes

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:12:

GGGGATCCYT TYTGNGCYTT YAGDATCAT

29

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:13:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
(A) LENGTH: 26 base pairs  
(B) TYPE: nucleic acid  
(C) STRANDEDNESS: single  
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(iv) ANTISENSE: yes

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:13:

GGGGATCCYT CACARTAYAA DATRTA

26

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:14:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
  - (A) LENGTH: 26 base pairs
  - (B) TYPE: nucleic acid
  - (C) STRANDEDNESS: single
  - (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(iv) ANTISENSE: yes

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:14:

GGGGATCCYT CACARTANAG DATRTA

26

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:15:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
  - (A) LENGTH: 7 amino acids
  - (B) TYPE: amino acid
  - (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(v) FRAGMENT TYPE: internal

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:15:

Gly Gln Arg Val Val Phe Ile  
1 5

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:16:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
  - (A) LENGTH: 29 base pairs
  - (B) TYPE: nucleic acid
  - (C) STRANDEDNESS: single
  - (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:16:

GGGCTCGAGG CCAGCGTGTC GTGTTTCATC

29

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:17:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
  - (A) LENGTH: 7 amino acids
  - (B) TYPE: amino acid
  - (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(v) FRAGMENT TYPE: internal

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:17:

Gln Pro Ser Pro Val Arg Asp  
1 5

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:18:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
 (A) LENGTH: 30 base pairs  
 (B) TYPE: nucleic acid  
 (C) STRANDEDNESS: single  
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:18:

GGGCTCGAGC AGCCGTCCCC GGTGAGGGAC

30

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:19:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
 (A) LENGTH: 7 amino acids  
 (B) TYPE: amino acid  
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(v) FRAGMENT TYPE: internal

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:19:

Gln Glu Leu Ala Glu Asp Phe  
1 5

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:20:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
 (A) LENGTH: 20 base pairs  
 (B) TYPE: nucleic acid  
 (C) STRANDEDNESS: single  
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:20:

CARGARGCNC TDGARGAYTT

20

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:21:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
  - (A) LENGTH: 34 base pairs
  - (B) TYPE: nucleic acid
  - (C) STRANDEDNESS: single
  - (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(iv) ANTISENSE: yes

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:21:

GGGGAGATCT CGAGAGGAAG CTGCGGCCGC TGCA

34

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:22:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
  - (A) LENGTH: 58 base pairs
  - (B) TYPE: nucleic acid
  - (C) STRANDEDNESS: single
  - (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(iv) ANTISENSE: yes

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:22:

CGAATACGAC TCACTATAGG AAGCTGCGGC CGCTGCAGTA CTTTTTTTTT TTTTTTTT

58

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:23:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
  - (A) LENGTH: 20 base pairs
  - (B) TYPE: nucleic acid
  - (C) STRANDEDNESS: single
  - (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(iv) ANTISENSE: yes

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:23:

CGAATACGAC TCACTATAGG

20



## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:24:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
  - (A) LENGTH: 26 base pairs
  - (B) TYPE: nucleic acid
  - (C) STRANDEDNESS: single
  - (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(iv) ANTISENSE: yes

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:24:

CCTAGGAGGA AGCTGCGGCC GCTGCA

26

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:25:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
  - (A) LENGTH: 20 base pairs
  - (B) TYPE: nucleic acid
  - (C) STRANDEDNESS: single
  - (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:25:

GGGTCTAGAG GTACCGTCCG

20

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:26:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
  - (A) LENGTH: 30 base pairs
  - (B) TYPE: nucleic acid
  - (C) STRANDEDNESS: single
  - (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:26:

GGGTCTAGAG GTACCGTCCG ATCGATCATT

30

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:27:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
  - (A) LENGTH: 13 base pairs
  - (B) TYPE: nucleic acid
  - (C) STRANDEDNESS: single
  - (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(iv) ANTISENSE: yes

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:27:

AATGATCGAT GCT

13

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:28:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
 (A) LENGTH: 10 amino acids  
 (B) TYPE: amino acid  
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(v) FRAGMENT TYPE: internal

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:28:

Lys	Trp	Tyr	Leu	Lys	Ala	Met	Thr	Ala	Asp
1				5					10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:29:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
 (A) LENGTH: 30 base pairs  
 (B) TYPE: nucleic acid  
 (C) STRANDEDNESS: single  
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:29:

AAATGGGTAYC TNAARGCNAT GACAGCAGAC

30

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:30:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
 (A) LENGTH: 7 amino acids  
 (B) TYPE: amino acid  
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(v) FRAGMENT TYPE: internal

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:30:

Gln	Glu	Val	Pro	Glu	Lys	Pro
1				5		

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:31:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
  - (A) LENGTH: 29 base pairs
  - (B) TYPE: nucleic acid
  - (C) STRANDEDNESS: single
  - (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(iv) ANTISENSE: yes

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:31:

GGGGATCCAG GCTTCTCAGG CACCTCCTG

29

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:32:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
  - (A) LENGTH: 6 amino acids
  - (B) TYPE: amino acid
  - (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(v) FRAGMENT TYPE: internal

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:32:

Asp Ser Val Thr Pro Met  
1 5

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:33:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
  - (A) LENGTH: 25 base pairs
  - (B) TYPE: nucleic acid
  - (C) STRANDEDNESS: single
  - (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(iv) ANTISENSE: yes

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:33:

GGGGATCCAT GGGAGTCACT GAGTC

25

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:34:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
  - (A) LENGTH: 8 amino acids
  - (B) TYPE: amino acid
  - (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(v) FRAGMENT TYPE: internal

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:34:

Met Lys Thr Leu Leu Leu Thr Ile  
1 5

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:35:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
  - (A) LENGTH: 31 base pairs
  - (B) TYPE: nucleic acid
  - (C) STRANDEDNESS: single
  - (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:35:

CCTCGAGATG AAGACCCTGC TCCTCACCAT C

31

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:36:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
  - (A) LENGTH: 33 base pairs
  - (B) TYPE: nucleic acid
  - (C) STRANDEDNESS: single
  - (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(iv) ANTISENSE: yes

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:36:

GGGAGATCTC AGAGGGTCAT GGAGCTGCTG CCC

33

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:37:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
  - (A) LENGTH: 35 base pairs
  - (B) TYPE: nucleic acid
  - (C) STRANDEDNESS: single
  - (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:37:

CCCTCGAGGA CACTGTGGCT GTGTCAGGGA AATGG

35

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:38:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
- (A) LENGTH: 18 base pairs
  - (B) TYPE: nucleic acid
  - (C) STRANDEDNESS: single
  - (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:38:

CCTGAGAAGC CTGACTCA

18

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:39:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
- (A) LENGTH: 21 base pairs
  - (B) TYPE: nucleic acid
  - (C) STRANDEDNESS: single
  - (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:39:

ACTGCATACG AGGGCCAGCG T

21

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:40:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
- (A) LENGTH: 29 base pairs
  - (B) TYPE: nucleic acid
  - (C) STRANDEDNESS: single
  - (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:40:

GGGAATTCCA GCCGTCCCCG GTGAGGGAC

29

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:41:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
  - (A) LENGTH: 21 base pairs
  - (B) TYPE: nucleic acid
  - (C) STRANDEDNESS: single
  - (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:41:

ATCACCATGC TGACAAATGG T

21

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:42:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
  - (A) LENGTH: 21 base pairs
  - (B) TYPE: nucleic acid
  - (C) STRANDEDNESS: single
  - (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(iv) ANTISENSE: yes

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:42:

AATCTCCTGG TTCAATCCTT T

21

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:43:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
  - (A) LENGTH: 21 base pairs
  - (B) TYPE: nucleic acid
  - (C) STRANDEDNESS: single
  - (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(iv) ANTISENSE: yes

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:43:

ACGCTGCCCC TCGTATGCAG T

21

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:44:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
  - (A) LENGTH: 25 base pairs
  - (B) TYPE: nucleic acid
  - (C) STRANDEDNESS: single
  - (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(iv) ANTISENSE: yes

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:44:

GGGGATCCAT GGGAGTCACT GAGTC

25

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:45:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 21 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(iv) ANTISENSE: yes

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:45:

GTGCAGGACC ACCGTGATGT T

21

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:46:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 10 amino acids

(B) TYPE: amino acid

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(v) FRAGMENT TYPE: internal

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:46:

Glu	Phe	Asp	Thr	Val	Ala	Val	Ser	Gly	Lys
1				5					10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:47:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 31 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:47:

GGAATTCGAC ACTGTGGCTG TGTCAAGGAA A

31

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:48:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
  - (A) LENGTH: 7 amino acids
  - (B) TYPE: amino acid
  - (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(v) FRAGMENT TYPE: internal

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:48:

Glu Phe Ser Arg Ala Lys Gly  
1 5

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:49:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
  - (A) LENGTH: 22 base pairs
  - (B) TYPE: nucleic acid
  - (C) STRANDEDNESS: single
  - (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:49:

GAGTTCTCAA GAGCCAAAGG AT

22

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:50:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
  - (A) LENGTH: 22 base pairs
  - (B) TYPE: nucleic acid
  - (C) STRANDEDNESS: single
  - (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(iv) ANTISENSE: yes

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:50:

ATCCTTTGGC TATTGAGAAC TC

22



(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 31 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(iv) ANTISENSE: yes

GGGAGATCTA CTGTCCTCCT GGAGAGCAGG T

31

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
 (A) LENGTH: 7 amino acids  
 (B) TYPE: amino acid  
 (D) TOPOLOGY: linear

(v) FRAGMENT TYPE: internal

Thr Cys Ser Pro Gly Gly Gln  
1 5

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
(A) LENGTH: 15 amino acids  
(B) TYPE: amino acid  
(D) TOPOLOGY: linear

(v) FRAGMENT TYPE: internal

Met Gly His His His His His His Glu Phe Asp Thr Val Ala Val  
1 5 10 15

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:54:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
  - (A) LENGTH: 37 base pairs
  - (B) TYPE: nucleic acid
  - (C) STRANDEDNESS: single
  - (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:54:

CCCCTCGAGC CACATGAAGA CCCTGCTCCT CACCATC

37

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:55:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
  - (A) LENGTH: 27 amino acids
  - (B) TYPE: amino acid
  - (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(v) FRAGMENT TYPE: internal

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:55:

Glu	Phe	Ser	Arg	Ala	Asn	Lys	Gly	Leu	Asn	Gln	Glu	Ile	Leu	Glu	Leu
1					5				10					15	
Ala	Gln	Ser	Glu	Thr	Cys	Ser	Pro	Gly	Gly	Gln					
			20					25							

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:56:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
  - (A) LENGTH: 78 base pairs
  - (B) TYPE: nucleic acid
  - (C) STRANDEDNESS: single
  - (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:56:

GAATTCTCAA	GAGCCAAAGG	ATTGAACCAG	GAGATTTTGG	AACTCGCGCA	GAGCGAAACC	60
TGCTCTCCAG	GAGGACAG					78

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:57:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
  - (A) LENGTH: 26 base pairs
  - (B) TYPE: nucleic acid
  - (C) STRANDEDNESS: single
  - (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:57:

GGGAATTCTC AAGAGCCAAA AGGATT

26

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:58:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
  - (A) LENGTH: 14 amino acids
  - (B) TYPE: amino acid
  - (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(v) FRAGMENT TYPE: internal

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:58:

Glu	Thr	Cys	Ser	Pro	Gly	Gly	Gln	His	His	His	His	His	His
1					5								10

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:59:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
  - (A) LENGTH: 52 base pairs
  - (B) TYPE: nucleic acid
  - (C) STRANDEDNESS: single
  - (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(iv) ANTISENSE: yes

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:59:

TTTAGATCTA GTGGTGGTGG TGGTGGTGCT GTCCTCCTGG AGAGCAGGTT TC

52

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:60:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
  - (A) LENGTH: 23 base pairs
  - (B) TYPE: nucleic acid
  - (C) STRANDEDNESS: single
  - (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(iv) ANTISENSE: yes

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:60:

TTTAGATCTA GTGGTGGTGG TGG

23

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:61:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 145 amino acids

(B) TYPE: amino acid

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(v) FRAGMENT TYPE: internal

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:61:

Asp	Thr	Val	Ala	Val	Ser	Gly	Lys	Trp	Tyr	Leu	Lys	Ala	Met	Thr	Ala	1	5	10	15
Asp	Gln	Glu	Val	Pro	Glu	Lys	Pro	Asp	Ser	Val	Thr	Pro	Met	Ile	Leu	20	25	30	
Lys	Ala	Gln	Lys	Gly	Gly	Asn	Leu	Glu	Ala	Lys	Ile	Thr	Met	Leu	Thr	35	40	45	
Asn	Gly	Gln	Cys	Gln	Asn	Ile	Thr	Val	Val	Leu	His	Lys	Thr	Ser	Glu	50	55	60	
Pro	Gly	Lys	Tyr	Thr	Ala	Tyr	Glu	Gly	Gln	Arg	Val	Val	Phe	Ile	Gln	65	70	75	80
Pro	Ser	Pro	Val	Arg	Asp	Arg	Tyr	Ile	Leu	Tyr	Cys	Glu	Gly	Asp	Leu	85	90	95	
Leu	Pro	Gln	Ala	His	Leu	Leu	His	Pro	Ser	Cys	His	His	His	Ser	Leu	100	105	110	
Leu	Gln	Ala	His	His	Arg	Leu	Leu	Leu	Pro	His	Lys	Lys	Leu	Leu	Gln	115	120	125	
Gly	Asp	Pro	Cys	Val	Ala	Gln	Trp	Phe	Ser	Ala	Cys	Leu	Gly	Leu	Arg	130	135	140	
Ala																145			

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:62:

## (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 144 amino acids  
 (B) TYPE: amino acid  
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(v) FRAGMENT TYPE: internal

## (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:62:

```

Asp Thr Val Ala Val Ser Gly Lys Trp Tyr Leu Lys Ala Met Thr Ala
 1           5           10           15
Asp Gln Glu Val Pro Glu Lys Pro Asp Ser Val Thr Pro Met Ile Leu
          20           25           30
Lys Ala Gln Lys Gly Gly Asn Leu Glu Ala Lys Ile Thr Met Leu Thr
          35           40           45
Asn Gly Gln Cys Gln Asn Ile Thr Val Val Leu His Lys Thr Ser Glu
          50           55           60
Pro Gly Lys Tyr Thr Ala Tyr Glu Gly Gln Arg Val Val Phe Ile Gln
          65           70           75           80
Pro Ser Pro Val Arg Asp His Tyr Ile Leu Tyr Cys Glu Gly Glu Leu
          85           90           95
His Gly Arg Gln Ile Arg Met Ala Lys Leu Leu Gly Arg Asp Pro Glu
          100          105          110
Gln Ala His His Arg Leu Leu Leu Pro His Lys Lys Leu Leu Gln Gly
          115          120          125
Asp Pro Cys Val Ala Gln Trp Phe Ser Ala Cys Leu Gly Leu Arg Ala
          130          135          140

```

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:63:

## (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 98 amino acids  
 (B) TYPE: amino acid  
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(v) FRAGMENT TYPE: internal

## (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:63:

```

Pro Glu Lys Pro Asp Ser Val Thr Pro Met Ile Leu Lys Ala Gln Lys
 1           5           10           15

```

Gly Gly Asn Leu Glu Ala Lys Ile Thr Met Leu Thr Asn Gly Gln Cys  
                     20                    25                    30  
 Gln Asn Ile Thr Val Val Leu His Lys Thr Ser Glu Pro Gly Lys Tyr  
                     35                    40                    45  
 Thr Ala Tyr Glu Gly Gln Arg Val Val Phe Ile Gln Pro Ser Pro Val  
                     50                    55                    60  
 Arg Asp His Tyr Ile Leu Tyr Cys Glu Gly Glu Leu His Gly Arg Gln  
                     65                    70                    75                    80  
 Ile Arg Met Ala Lys Gly Leu Asn Gln Glu Ile Leu Glu Leu Ala Gln  
                     85                    90                    95  
 Ser Glu Thr Cys Ser Pro Gly Gly Gln  
                     100                    105

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:64:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
     (A) LENGTH: 11 amino acids  
     (B) TYPE: amino acid  
     (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(v) FRAGMENT TYPE: internal

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:64:

Met Ala Lys Leu Leu Gly Arg Asp Pro Glu Gln  
   1                    5                    10

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:65:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
     (A) LENGTH: 38 amino acids  
     (B) TYPE: amino acid  
     (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(v) FRAGMENT TYPE: internal

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:65:

Met Ala Lys Leu Leu Gly Arg Asp Pro Glu Gln Ser Gln Glu Ala Leu  
   1                    5                    10                    15

Glu Asp Phe Glu Phe Ser Ala Lys Gly Leu Asn Gln Glu Ile Leu Glu  
                     20                    25                    30

Leu Ala Gln Ser Glu Thr  
                     35

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:66:

## (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 8 amino acids  
 (B) TYPE: amino acid  
 (D) TOPOLOGY: linear

## (ii) MOLECULE TYPE: peptide

## (v) FRAGMENT TYPE: internal

## (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:66:

Asp Pro Glu Gln Ser Glu Glu Ala  
 1 5

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:67:

## (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 791 base pairs  
 (B) TYPE: nucleic acid  
 (C) STRANDEDNESS: single  
 (D) TOPOLOGY: linear

## (ii) MOLECULE TYPE: cDNA

## (ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: CDS  
 (B) LOCATION: 195..734

## (ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: mat\_peptide  
 (B) LOCATION: 253..734

## (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:67:

AGAGCTGGAC CCGTGTGTGT GCTGGCCAAT GAGCCCTGGA GGGTCCGGCT CCAGAGTACC	60
CTCTTGGCAC AGGGCCGAGT CCATCGGGAC AGATGAACCT AGAGGACTCC ACTGCCCTCC	120
CATCCACGGG GCCGGGTCAC CAGACTCTGC AAGTCTCCAG CTGTCGCCAA ACCCAGACAG	180
AAGGTGCTGT GGAC ATG CAG CTC CTA CTG CTG ACC GTG GGC CTG GCA CTG	230
Met Gln Leu Leu Leu Leu Thr Val Gly Leu Ala Leu	
-19 -15 -10	
ATC TGT GGC CTC CAG GCT CAG GAG GGA AAC CAT GAG GAG CCC CAG GGA	278
Ile Cys Gly Leu Gln Ala Gln Glu Gly Asn His Glu Glu Pro Gln Gly	
-5 1 5	
GGC CTA GAG GAG CTG TCT GGG AGG TGG CAC TCC GTT GCC CTG GCC TCC	326
Gly Leu Glu Glu Leu Ser Gly Arg Trp His Ser Val Ala Leu Ala Ser	
10 15 20 25	

AAC AAG TCC GAT CTG ATC AAA CCC TGG GGG CAC TTC AGG GTT TTC ATC Asn Lys Ser Asp Leu Ile Lys Pro Trp Gly His Phe Arg Val Phe Ile 30 35 40	374
CAC AGC ATG AGC GCA AAG GAC GGC AAC CTG CAC GGG GAT ATC CTT ATA His Ser Met Ser Ala Lys Asp Gly Asn Leu His Gly Asp Ile Leu Ile 45 50 55	422
CCG CAG GAC GGC CAG TGC GAG AAA GTC TCC CTC ACT GCG TTC AAG ACT Pro Gln Asp Gly Gln Cys Glu Lys Val Ser Leu Thr Ala Phe Lys Thr 60 65 70	470
GCC ACC AGC AAC AAA TTT GAC CTG GAG TAC TGG GGA CAC AAT GAC CTG Ala Thr Ser Asn Lys Phe Asp Leu Glu Tyr Trp Gly His Asn Asp Leu 75 80 85	518
TAC CTG GCA GAG GTA GAC CCC AAG AGC TAC CTG ATT CTC TAC ATG ATC Tyr Leu Ala Glu Val Asp Pro Lys Ser Tyr Leu Ile Leu Tyr Met Ile 90 95 100 105	566
AAC CAG TAC AAC GAT GAC ACC AGC CTG GTG GCT CAC TTG ATG GTC CGG Asn Gln Tyr Asn Asp Asp Thr Ser Leu Val Ala His Leu Met Val Arg 110 115 120	614
GAC CTC AGC AGG CAG CAG GAC TTC CTG CCG GCA TTC GAA TCT GTA TGT Asp Leu Ser Arg Gln Gln Asp Phe Leu Pro Ala Phe Glu Ser Val Cys 125 130 135	662
GAA GAC ATC GGT CTG CAC AAG GAC CAG ATT GTG GTT CTG AGC GAT GAC Glu Asp Ile Gly Leu His Lys Asp Gln Ile Val Val Leu Ser Asp Asp 140 145 150	710
GAT CGC TGC CAG GGT TCC AGA GAC TAGGGCCTCA GCCACGCAGA GAGCCAAGCA Asp Arg Cys Gln Gly Ser Arg Asp 155 160	764
GCAGGATCTC ACCTGCCTGA GTACGGT	791

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:68:

## (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 180 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (D) TOPOLOGY: linear

## (ii) MOLECULE TYPE: protein

## (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:68:

Met Gln Leu Leu Leu Leu Thr Val Gly Leu Ala Leu Ile Cys Gly Leu  
-19 -15 -10 -5

Gln Ala Gln Glu Gly Asn His Glu Glu Pro Gln Gly Gly Leu Glu Glu  
1 5 10

Leu Ser Gly Arg Trp His Ser Val Ala Leu Ala Ser Asn Lys Ser Asp  
15 20 25



Leu Ile Lys Pro Trp Gly His Phe Arg Val Phe Ile His Ser Met Ser  
 30 35 40 45  
 Ala Lys Asp Gly Asn Leu His Gly Asp Ile Leu Ile Pro Gln Asp Gly  
 50 55 60  
 Gln Cys Glu Lys Val Ser Leu Thr Ala Phe Lys Thr Ala Thr Ser Asn  
 65 70 75  
 Lys Phe Asp Leu Glu Tyr Trp Gly His Asn Asp Leu Tyr Leu Ala Glu  
 80 85 90  
 Val Asp Pro Lys Ser Tyr Leu Ile Leu Tyr Met Ile Asn Gln Tyr Asn  
 95 100 105  
 Asp Asp Thr Ser Leu Val Ala His Leu Met Val Arg Asp Leu Ser Arg  
 110 115 120 125  
 Gln Gln Asp Phe Leu Pro Ala Phe Glu Ser Val Cys Glu Asp Ile Gly  
 130 135 140  
 Leu His Lys Asp Gln Ile Val Val Leu Ser Asp Asp Asp Arg Cys Gln  
 145 150 155  
 Gly Ser Arg Asp  
 160

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:69:

## (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 793 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

## (ii) MOLECULE TYPE: cDNA

## (ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: CDS
- (B) LOCATION: 3..533

## (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:69:

AC AGC ACC TTC TGT CTG GGT TTG GCA CTG ATC TGT GGC CTC CAG GCT	47
Ser Thr Phe Cys Leu Gly Leu Ala Leu Ile Cys Gly Leu Gln Ala	
1 5 10 15	
CAG GAG GGA AAC CAT GAG GAG CCC CAG GGA GGC CTA GAG GAG CTG TCT	95
Gln Glu Gly Asn His Glu Glu Pro Gln Gly Gly Leu Glu Glu Leu Ser	
20 25 30	
GGG AGG TGG CAC TCC GTT GCC CTG GCC TCC AAC AAG TCC GAT CTG ATC	143
Gly Arg Trp His Ser Val Ala Leu Ala Ser Asn Lys Ser Asp Leu Ile	
35 40 45	

AAA CCC TGG GGG CAC TTC AGG GTT TTC ATC CAC AGC ATG AGC GCA AAG	191
Lys Pro Trp Gly His Phe Arg Val Phe Ile His Ser Met Ser Ala Lys	
50 55 60	
GAC GGC AAC CTG CAC GGG GAT ATC CTT ATA CCG CAG GAC GGC CAG TGC	239
Asp Gly Asn Leu His Gly Asp Ile Leu Ile Pro Gln Asp Gly Gln Cys	
65 70 75	
GAG AAA GTC TCC CTC ACT GCG TTC AAG ACT GCC ACC AGC AAC AAA TTT	287
Glu Lys Val Ser Leu Thr Ala Phe Lys Thr Ala Thr Ser Asn Lys Phe	
80 85 90 95	
GAC CTG GAG TAC TGG GGA CAC AAT GAC CTG TAC CTG GCA GAG GTA GAC	335
Asp Leu Glu Tyr Trp Gly His Asn Asp Leu Tyr Leu Ala Glu Val Asp	
100 105 110	
CCC AAG AGC TAC CTG ATT CTC TAC ATG ATC AAC CAG TAC AAC GAT GAC	383
Pro Lys Ser Tyr Leu Ile Leu Tyr Met Ile Asn Gln Tyr Asn Asp Asp	
115 120 125	
ACC AGC CTG GTG GCT CAC CTG ATG GTC CGG GAC CTC AGC AGG CAG CAG	431
Thr Ser Leu Val Ala His Leu Met Val Arg Asp Leu Ser Arg Gln Gln	
130 135 140	
GAC TTC CTG CCG GCA TTC GAA TCT GTA TGT GAA GAC ATC GGT CTG CAC	479
Asp Phe Leu Pro Ala Phe Gln Ser Val Cys Glu Asp Ile Gly Leu His	
145 150 155	
AAG GAC CAG ATT GTG GTT CTG AGC GAT GAC GAT CGC TGC CAG GGT TCC	527
Lys Asp Gln Ile Val Val Leu Ser Asp Asp Arg Cys Gln Gly Ser	
160 165 170 175	
AGA GAC TAGGGCCTCA GCCTACGCAG AGAGCCAAGC AGCAGGATCT CACCTGCCTG	583
Arg Asp	
AGGACTCAGA CCTATAGGCT CGGGGGACAC CGTACTCAGC TCTGCGTCCC TCTCTGCGAA	643
CCCTCCAGGT GATCCCAGCA ACAACACCCA CCTGNGCTTC CATGTGCGGN CCTGTCCAGC	703
CTGCGCCAC TCCCTGCCTG GGCAGCCACA CACTCCCCAG CCCCTGCTA TGGTCCCTCC	763
TCGCATAATA AAGGACATTC CGTTCAAAAA	793

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:70:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
- (A) LENGTH: 177 amino acids
  - (B) TYPE: amino acid
  - (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: protein

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:70:

Ser Thr Phe Cys Leu Gly Leu Ala Leu Ile Cys Gly Leu Gln Ala Gln  
 1 5 10 15

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 71:

(A) LENGTH: 774 base pairs  
(B) TYPE: nucleic acid  
(C) STRANDEDNESS: single  
(D) TOPOLOGY: linear

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: CDS  
(B) LOCATION: 1..537

CAG	CTC	CTA	CTG	CTG	ACC	GTG	GGC	CTG	GCA	CTG	ATC	TGT	GGC	CTC	CAG
Gln	Leu	Leu	Leu	Leu	Thr	Val	Gly	Leu	Ala	Leu	Ile	Cys	Gly	Leu	Gln
1				5					10					15	
GCT	CAG	GAG	GGA	AAC	CAT	GAG	GAG	CCC	CAG	GGA	GGC	CTA	GAG	GAG	CTG
Ala	Gln	Glu	Gly	Asn	His	Glu	Glu	Pro	Gln	Gly	Gly	Leu	Glu	Glu	Leu
			20					25					30		

48

96

TCT GGG AGG TGG CAC TCC GTT GCC CTG GCC TCC AAC AAG TCC GAT CTG	144
Ser Gly Arg Trp His Ser Val Ala Leu Ala Ser Asn Lys Ser Asp Leu	
35 40 45	
ACC AAA CCC TGG GGG CAC TTC AGG GTT TTC ATC CAC AGC ATG AGC GCA	192
Thr Lys Pro Trp Gly His Phe Arg Val Phe Ile His Ser Met Ser Ala	
50 55 60	
AAG GAC GTC AAC CTG CAC GGG GAT ATC CTT ATA CCG CAG GAC GGC CAG	240
Lys Asp Val Asn Leu His Gly Asp Ile Leu Ile Pro Gln Asp Gly Gln	
65 70 75 80	
TGC GAG AAA GTC TCC CTC ACT GCG TTC AAG ACT GCC ACC AGC AAC AAA	288
Cys Glu Lys Val Ser Leu Thr Ala Phe Lys Thr Ala Thr Ser Asn Lys	
85 90 95	
TTT GAC CTG GAG TAC TGG GGA CAC AAT GAC CTG TAC CTG GCA GAG GTA	336
Phe Asp Leu Glu Tyr Trp Gly His Asn Asp Leu Tyr Leu Ala Glu Val	
100 105 110	
GAC CCC AAG AGC TAC CTG ATT CTC TAC ATG ATC AAC CAG TAC AAC GAT	384
Asp Pro Lys Ser Tyr Leu Ile Leu Tyr Met Ile Asn Gln Tyr Asn Asp	
115 120 125	
GAC ACC AGC CTG GTG GCT CAC CTG ATG GTC CGG GAC CTC AGC AGG CAG	432
Asp Thr Ser Leu Val Ala His Leu Met Val Arg Asp Leu Ser Arg Gln	
130 135 140	
CAG GAC TTC CTG CCG GCA TTC GAA TCT GTA TGT GAA GAC ATC GGT CTG	480
Gln Asp Phe Leu Pro Ala Phe Glu Ser Val Cys Glu Asp Ile Gly Leu	
145 150 155 160	
CAC AAG GAC CAG ATT GTG GTT CTG AGC GAT GAC GAT CGC TGC CAG GGT	528
His Lys Asp Gln Ile Val Val Leu Ser Asp Asp Asp Arg Cys Gln Gly	
165 170 175	
TCC AGA GAC TAGGGCCTCA GCCCAGCGCAG AGAGCCAAGC AGCAGGATCT	577
Ser Arg Asp	
CACCTGCCTG AGGACTCAGA CCTATAGGCT CGGGGGACAC CGTACTCAGC TCTGCGTCCC	637
TCTCTGCGAA CCCTCCAGGT GATCCCAGCA ACAACACCCA CCTGCGCTTC CATGTGCGGC	697
CCTGTCCAGC CTGCGCCAC TCCCTGCCTG GGCAGCCACA CACTCCCCAG CCCCCTGCTA	757
TGGTCCCTCC TCGCATA	774

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:72:

## (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 179 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (D) TOPOLOGY: linear

## (ii) MOLECULE TYPE: protein

## (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:72:

Gln Leu Leu Leu Leu Thr Val Gly Leu Ala Leu Ile Cys Gly Leu Gln  
 1 5 10 15  
 Ala Gln Glu Gly Asn His Glu Glu Pro Gln Gly Gly Leu Glu Glu Leu  
 20 25 30  
 Ser Gly Arg Trp His Ser Val Ala Leu Ala Ser Asn Lys Ser Asp Leu  
 35 40 45  
 Thr Lys Pro Trp Gly His Phe Arg Val Phe Ile His Ser Met Ser Ala  
 50 55 60  
 Lys Asp Val Asn Leu His Gly Asp Ile Leu Ile Pro Gln Asp Gly Gln  
 65 70 75 80  
 Cys Glu Lys Val Ser Leu Thr Ala Phe Lys Thr Ala Thr Ser Asn Lys  
 85 90 95  
 Phe Asp Leu Glu Tyr Trp Gly His Asn Asp Leu Tyr Leu Ala Glu Val  
 100 105 110  
 Asp Pro Lys Ser Tyr Leu Ile Leu Tyr Met Ile Asn Gln Tyr Asn Asp  
 115 120 125  
 Asp Thr Ser Leu Val Ala His Leu Met Val Arg Asp Leu Ser Arg Gln  
 130 135 140  
 Gln Asp Phe Leu Pro Ala Phe Glu Ser Val Cys Glu Asp Ile Gly Leu  
 145 150 155 160  
 His Lys Asp Gln Ile Val Val Leu Ser Asp Asp Asp Arg Cys Gln Gly  
 165 170 175  
 Ser Arg Asp

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:73:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
- (A) LENGTH: 998 base pairs
  - (B) TYPE: nucleic acid
  - (C) STRANDEDNESS: single
  - (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

## (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:73:

AGAGCTGGAC CCGTGTGTGT GCTGGCCAAT GAGCCCTGGA GGGTCCGGCT CCAGAGTACC 60  
 CTCTTGGCAC AGGGCCGAGT CCATCGGGAC AGATGAACCT AGAGGACTCC ACTGCCCTCC 120  
 CATCCACGGG GCCGGGTAC CAGACTCTGC AAGTCTCCAG CTGTCGCCAA ACCCAGACAG 180  
 AAGGTGCTGT GGACATGCAG CTCCTACWGC ACYKWCYGTG TGGGYTTGGC ACTGATCTGT 240

GGCCTCCAGG CTCAGGAGGG AAACCATGAG GAGCCCCAGG GAGGCCTAGA GGAGCTGTCT 300  
 GGGAGGTGGC ACTCCGTTGC CCTGGCCTCC AACAAGTCCG ATCTGAYCAA ACCCTGGGGG 360  
 CACTTCAGGG TTTTCATCCA CAGCATGAGC GCAAAGGACG KCAACCTGCA CGGGGATATC 420  
 CTTATACCGC AGGACGGCCA GTGCGAGAAA GTCTCCCTCA CTGCGTTCAA GACTGCCACC 480  
 AGCAACAAAT TTGACCTGGA GTACTGGGGA CACAATGACC TGTACCTGGC AGAGGTAGAC 540  
 CCCAAGAGCT ACCTGATTCT CTACATGATC AACCAGTACA ACGATGACAC CAGCCTGGTG 600  
 GCTCACYTGA TGGTCCGGGA CCTCAGCAGG CAGCAGGACT TCCTGCCGGC ATTCTGAATCT 660  
 GTATGTGAAG ACATCGGTCT GCACAAGGAC CAGATTGTGG TTCTGAGCGA TGACGATCGC 720  
 TGCCAGGGTT CCAGAGACTA GGGCCTCAGC CYACGCAGAG AGCCAAGCAG CAGGATCTCA 780  
 CCTGCCTGAG GACTCAGACC TATAGGCTCG GKGGACACCG TACTCAGCTC TGCGTCCCTC 840  
 TCTGCGAACC CTCCAGGTGA TCCCAGCAAC AACACCCACC TCGCCTTCCA TGTGCGGCCC 900  
 TGTCCAGCCT GCGCCCACTC CCTGCCTGGG CAGCCACACA CTCCCCAGCC CCCTGCTATG 960  
 GTCCCTCCTC GCATAATAAA GGACATTCCG TTCAAAAA 998

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:74:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
- (A) LENGTH: 30 base pairs
  - (B) TYPE: nucleic acid
  - (C) STRANDEDNESS: single
  - (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

## (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:74:

GGGGGATCCC AGATCGGACT TATTGGAGGC 30

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:75:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
- (A) LENGTH: 27 base pairs
  - (B) TYPE: nucleic acid
  - (C) STRANDEDNESS: single
  - (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

## (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:75:

GGGGGATCCG GAGGCCAGGG CAACGGA 27

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:76:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
  - (A) LENGTH: 27 base pairs
  - (B) TYPE: nucleic acid
  - (C) STRANDEDNESS: single
  - (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:76:

GGGGGATCCA ACGGAGTGCC ACCTCCC

27

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:77:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
  - (A) LENGTH: 31 base pairs
  - (B) TYPE: nucleic acid
  - (C) STRANDEDNESS: single
  - (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:77:

GGGGGAATTC GAGGAGCTGT CTGGGAGGTG G

31

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:78:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
  - (A) LENGTH: 31 base pairs
  - (B) TYPE: nucleic acid
  - (C) STRANDEDNESS: single
  - (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:78:

GGGGGAATTC AGGTGGCACT CCGTTGCCCT G

31

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:79:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
  - (A) LENGTH: 31 base pairs
  - (B) TYPE: nucleic acid
  - (C) STRANDEDNESS: single
  - (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:79:

GGGGGAATTC GCCCTGGCCT CCAACAAGTC C

31

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:80:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 30 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:80:

GGGGGAATTC GAGGGAAACC ATGAGGAGCC

30

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:81:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 21 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:81:

GGACTTGTIG GAGGCCAGGG C

21

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:82:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 30 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:82:

GGGGGAATTC ATCAAACCCT GGGGGCACTT

30

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:83:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 29 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear



(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:83:

GGGGGATCCA AGTGCCCCCA GGGTTTGAT

29

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:84:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 20 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:84:

CACGGGGATA TCCTTATACC

20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:85:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 18 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:85:

GTACAACGAT GACACCAG

18

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:86:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 16 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:86:

TGTCCCCCGA GCCTAT

16

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 18 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:87:

18

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
(A) LENGTH: 38 amino acids  
(B) TYPE: amino acid  
(D) TOPOLOGY: linear

(v) FRAGMENT TYPE: internal

Pro Trp Gly His Phe Arg  
35

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 182 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (D) TOPOLOGY: linear

(v) FRAGMENT TYPE: internal

Met Lys Leu Ile Leu Leu Leu Leu Cys Leu Gly Leu Ile Leu Val Cys  
1 5 10 15

Glx Gly His Ala Glu Glu Ala Asn Ser Glu Arg Gly Asn Leu Asp Val  
 20. 25 30  
 Asp Lys Leu Asn Gly Asp Trp Phe Ser Ile Val Val Ala Ser Asn Lys  
 35 40 45  
 Arg Glu Lys Ile Glu Glu Asn Gly Ser Met Arg Val Phe Met Gln His  
 50 55 60  
 Ile Asp Val Leu Glu Asn Ser Leu Gly Phe Lys Leu Cys Ile Lys Glu  
 65 70 75 80  
 Asn Gly Glu Cys Arg Lys Leu Tyr Ser Val Ala Tyr Lys Thr Pro Lys  
 85 90 95  
 Ile Gly Glu Tyr Phe Leu Glu Tyr Asp Gly Gly Asn Thr Phe Thr Ile  
 100 105 110  
 Leu Lys Thr Asp Tyr Glu Arg Tyr Val Met Phe His Leu Val Asn Val  
 115 120 125  
 Asn Asn Gly Glu Ala Phe Gln Leu Met Glu Leu Tyr Gly Arg Thr Lys  
 130 135 140  
 Asp Leu Ser Ser Asp Ile Lys Glu Lys Phe Ala Lys Leu Cys Glu Ala  
 145 150 155 160  
 His Gly Ile Thr Arg Asp Asn Ile Ile Asp Leu Thr Lys Thr Asp Arg  
 165 170 175  
 Cys Leu Gln Ala Arg Gly  
 180

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:90:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
- (A) LENGTH: 182 amino acids
  - (B) TYPE: amino acid
  - (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(v) FRAGMENT TYPE: internal

## (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:90:

Met Lys Glx Met Leu Leu Leu Leu Cys Leu Gly Leu Ile Leu Val Cys  
 1 5 10 15  
 Glx Val His Ala Glu Glu Ala Ser Ser Thr Gly Arg Asn Phe Asn Val  
 20 25 30  
 Glu Lys Ile Asn Gly Glu Trp His Thr Ile Ile Leu Ala Ser Cys Lys  
 35 40 45  
 Arg Glu Lys Ile Glu Asp Asn Gly Asn Phe Arg Leu Phe Leu Glu Gln  
 50 55 60

Ile His Val Leu Glu Asn Ser Leu Val Leu Lys Phe His Thr Val Arg  
 65 70 75 80  
 Asp Glu Glu Cys Ser Glu Leu Ser Met Val Ala Asp Lys Thr Glu Lys  
 85 90 95  
 Ala Gly Glu Tyr Ser Val Thr Tyr Asp Gly Phe Asn Thr Phe Thr Ile  
 100 105 110  
 Pro Lys Thr Asp Tyr Asp Asn Phe Leu Met Ala His Leu Ile Asn Glu  
 115 120 125  
 Lys Asp Gly Glu Thr Phe Gln Leu Met Gly Leu Tyr Gly Arg Glu Pro  
 130 135 140  
 Asp Leu Met Ser Asp Ile Lys Glu Arg Phe Ala Gln Leu Cys Glu Glu  
 145 150 155 160  
 His Gly Ile Leu Arg Glu Asn Ile Ile Asp Leu Ser Asn Ala Asn Arg  
 165 170 175  
 Cys Leu Gln Ala Arg Glu  
 180

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:91:

## (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 24 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

## (ii) MOLECULE TYPE: cDNA

## (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:91:

GGGAATTCAA TCCATCGAAG GAAG

24

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:92:

## (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 24 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

## (ii) MOLECULE TYPE: cDNA

## (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:92:

GGGAATTCAA TCGATCGAAG GAAG

24

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:93:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
  - (A) LENGTH: 29 base pairs
  - (B) TYPE: nucleic acid
  - (C) STRANDEDNESS: single
  - (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:93:

CGTACGGAAA GATGCTGACC CCAGATCGG

29

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:94:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
  - (A) LENGTH: 27 base pairs
  - (B) TYPE: nucleic acid
  - (C) STRANDEDNESS: single
  - (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:94:

CTCTGAAAGA TGCTGACCCC AGATCGG

27

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:95:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
  - (A) LENGTH: 20 base pairs
  - (B) TYPE: nucleic acid
  - (C) STRANDEDNESS: single
  - (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:95:

GGGTCTAGAG GTACCGTCCG

20

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:96:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
  - (A) LENGTH: 33 base pairs
  - (B) TYPE: nucleic acid
  - (C) STRANDEDNESS: single
  - (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

33

(v) FRAGMENT TYPE: internal

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

47

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

45

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:100:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
  - (A) LENGTH: 35 base pairs
  - (B) TYPE: nucleic acid
  - (C) STRANDEDNESS: single
  - (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:100:

GGGCTCGAGG TCGAGTTTTT TTTTTTTTTT TTGAC

35

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:101:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
  - (A) LENGTH: 12 base pairs
  - (B) TYPE: nucleic acid
  - (C) STRANDEDNESS: single
  - (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:101:

CCGGAATTCC GG

12

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:102:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
  - (A) LENGTH: 13 base pairs
  - (B) TYPE: nucleic acid
  - (C) STRANDEDNESS: single
  - (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(iv) ANTISENSE: yes

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:102:

AATGATCGAT GCT

13

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:103:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
  - (A) LENGTH: 27 base pairs
  - (B) TYPE: nucleic acid
  - (C) STRANDEDNESS: single
  - (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:103:

GGGGGATCCC TAGTCTCTGG AACCCCTG

27

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:104:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 27 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:104:

GGGGAATTCTG AGGGAAACCA TGAGGAG

27

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:105:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 65 amino acids

(B) TYPE: amino acid

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(v) FRAGMENT TYPE: internal

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:105:

Asp Thr Val Ala Val Ser Gly Lys Trp Tyr Leu Lys Ala Met Thr Ala  
1 5 10 15

Asp Gln Glu Val Pro Glu Lys Pro Asp Ser Val Thr Pro Met Ile Leu  
20 25 30

Lys Ala Gln Lys Gly Gly Asn Leu Glu Ala Lys Ile Thr Met Leu Thr  
35 40 45

Asn Gly Gln Cys Gln Asn Ile Thr Val Val Leu His Lys Thr Ser Glu  
50 55 60

Pro  
65

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:106:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 53 amino acids

(B) TYPE: amino acid



(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(v) FRAGMENT TYPE: internal

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:106:

```

Thr Val Val Leu His Lys Thr Ser Glu Pro Gly Lys Tyr Thr Ala Tyr
 1             5             10             15
Glu Gly Gln Arg Val Val Phe Ile Gln Pro Ser Pro Val Arg Asp His
          20             25             30
Tyr Ile Leu Tyr Cys Glu Gly Glu Leu His Gly Arg Gln Ile Arg Met
          35             40             45
Ala Lys Leu Leu Gly
          50

```

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:107:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 60 amino acids

(B) TYPE: amino acid

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(v) FRAGMENT TYPE: internal

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:107:

```

Leu Tyr Cys Glu Gly Glu Leu His Gly Arg Gln Ile Arg Met Ala Lys
 1             5             10             15
Leu Leu Gly Arg Asp Pro Glu Gln Ser Gln Glu Ala Leu Glu Asp Phe
          20             25             30
Arg Glu Phe Ser Arg Ala Lys Gly Leu Asn Gln Glu Ile Leu Glu Leu
          35             40             45
Ala Gln Ser Glu Thr Cys Ser Pro Gly Gly Gln Xaa
          50             55             60

```

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:108:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 13 amino acids

(B) TYPE: amino acid

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(v) FRAGMENT TYPE: internal

## (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:108:

Gly Lys Trp Tyr Leu Lys Ala Met Thr Ala Asp Gln Glu  
1 5 10

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:109:

## (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 13 amino acids

(B) TYPE: amino acid

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(v) FRAGMENT TYPE: internal

## (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:109:

Ala Lys Ile Thr Met Leu Thr Asn Gly Gln Cys Gln Asn  
1 5 10

【図 1 A】

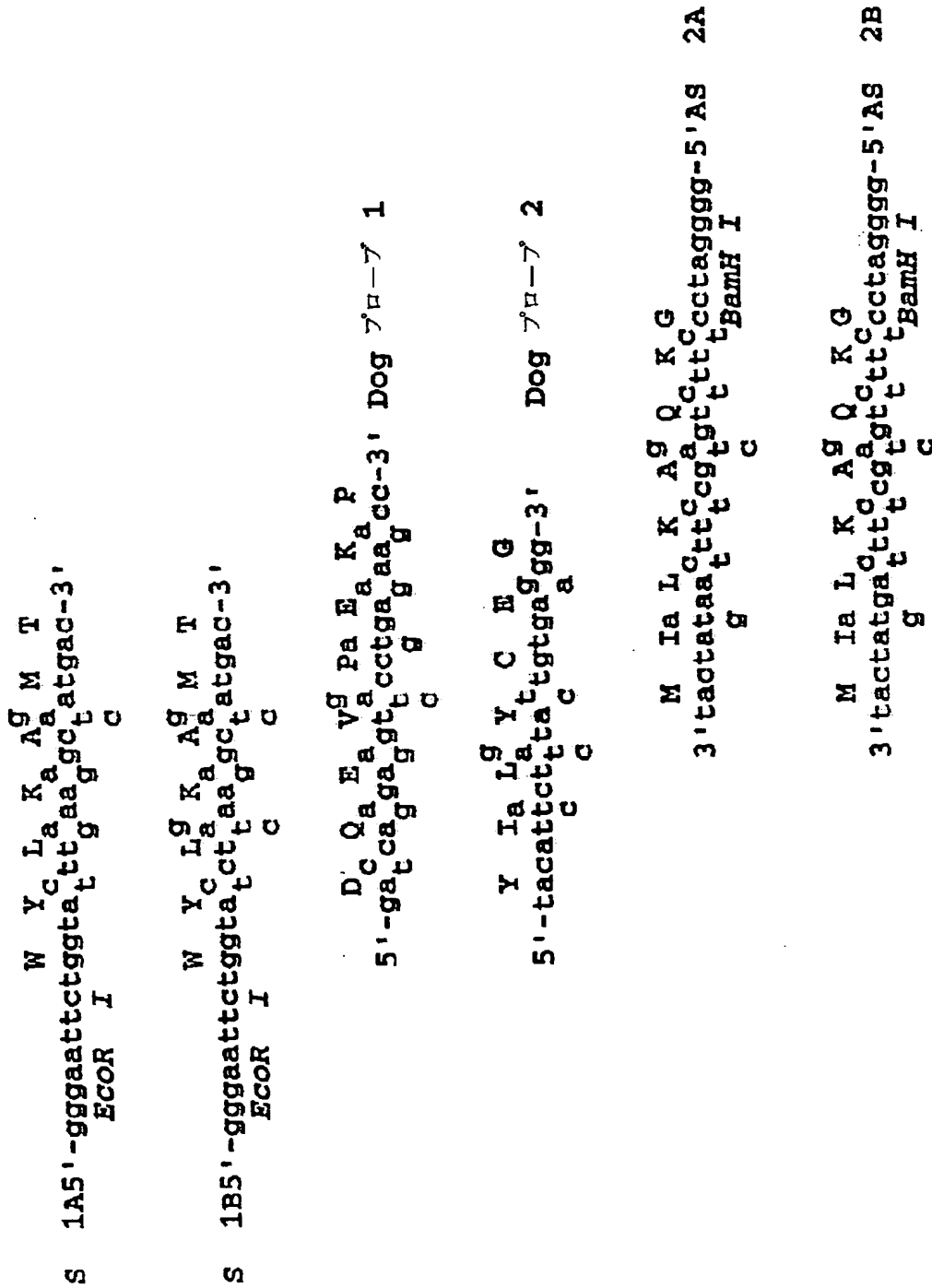


Fig. 1A

Y I a L Y C E G  
 3'atgatatgaatgacactcctagg-5'AS 3A  
 BamH I

Y I a L Y C E G  
 3'atgatatgaatgacactcctagg-5'AS 3B  
 BamH I

**Fig 1B**



【図 2 B】

Y Ia L<sup>g</sup> Y C E G  
 3'at<sup>a</sup>tataa<sup>c</sup>at<sup>a</sup>acact<sup>c</sup>cctaggg-5' AS 3A  
   g<sup>g</sup> BamH I

Y Ia L<sup>g</sup> Y C E G  
 3'at<sup>a</sup>tataa<sup>c</sup>at<sup>a</sup>acact<sup>c</sup>cctaggg-5' AS 3B  
   g<sup>g</sup> BamH I

Fig. 2B

【図3】

729A- 5'-gggtctagaggtagcgtccg-3'  
AP2 5'-gggtctagaggtagcgtccgatcgatcatt-3'  
*Xba*I Kpn I tagctagtaa -5'  
3'-tcg

K W Y L G K A G M T A D  
5'-aa<sup>a</sup>tggta<sup>c</sup>t<sup>a</sup>aa<sup>a</sup>gc<sup>t</sup>atgacagcac-3' Dog 70-7 0  
g c o

3'-tgcctccacggactcttcgga<sup>c</sup>g<sup>a</sup>g<sup>g</sup>g<sup>g</sup>g<sup>g</sup>-5'ASA  
3'-gtcctccacggactcttcgga<sup>c</sup>BamH I t<sup>a</sup>g<sup>g</sup>g<sup>g</sup>g<sup>g</sup>g<sup>g</sup>-5'ASB  
3'-ctgagtcactgagggtac<sup>c</sup>t<sup>a</sup>BamH I

Y Ia L Y C E G  
3'at<sup>a</sup>tataa<sup>c</sup>at<sup>a</sup>acact<sup>c</sup>cctagggg-5' AS 3A  
g g BamH I

Y Ia L<sup>g</sup> Y C E G  
3'at<sup>a</sup>tatga<sup>t</sup>at<sup>a</sup>acact<sup>c</sup>cctagggg-5' AS 3B  
g g BamH I

Fig. 3

【図 4】

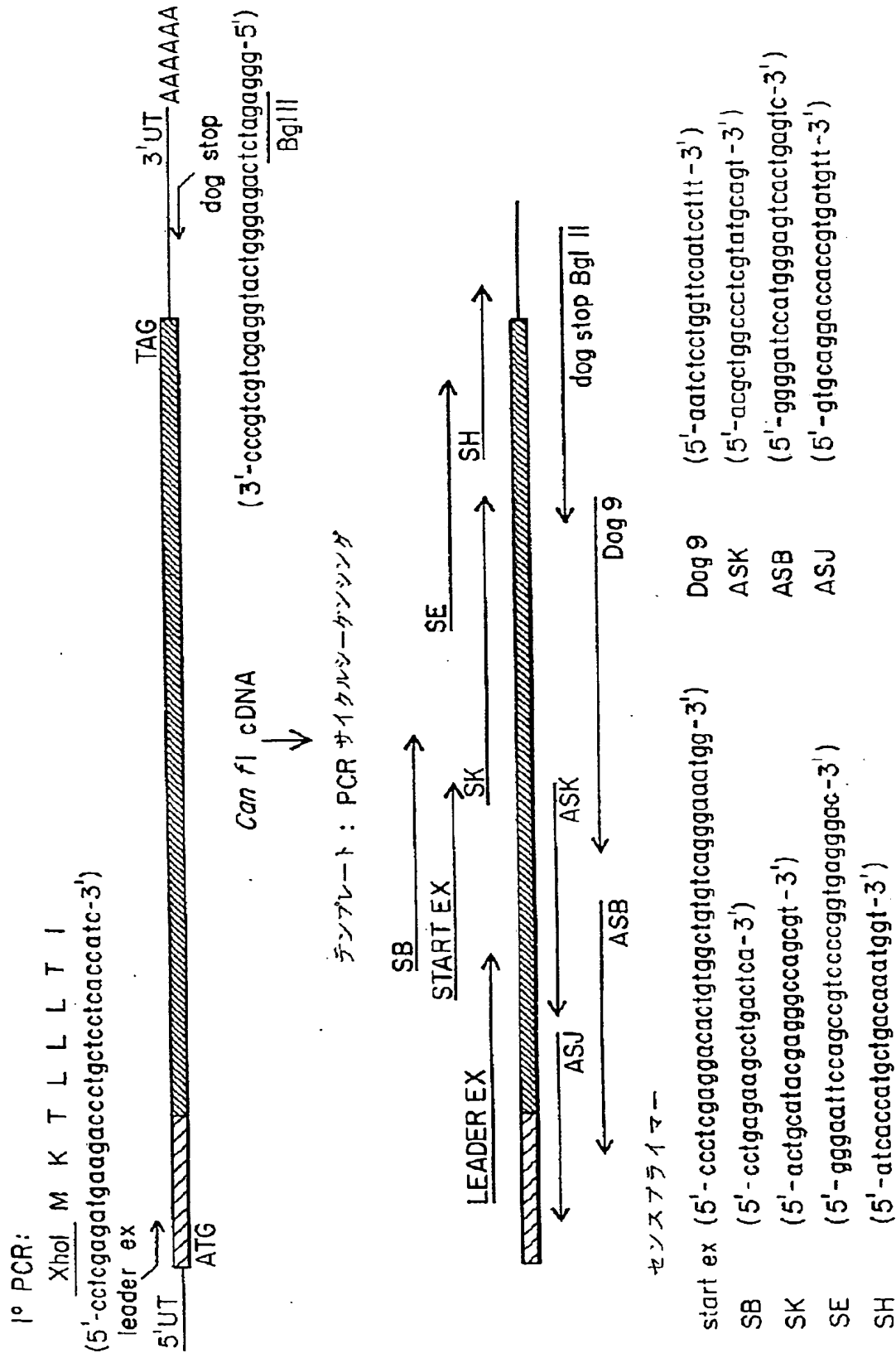


FIG. 4



【図 5 A】

10 20 30 40 50 60  
 ATGAAGACCTGCTCCTCACCATCGGCTTCAGCCTCATTTGGATCCTGCAGGCCAGGAT  
 -26  
 M K T L L L T I G F S L I A I L Q A Q D  
 -10  
 70 80 90 100 110 120  
 ACCCCAGCCTTGGGAAAGGACACTGTGGCTGTGTTCAGGGAAATGGTATCTGAAGGCCATG  
 1  
 T P A L G K D T V A V S G K W Y L K A M  
 10  
 130 140 150 160 170 180  
 ACAGCAGACCAGGAGGTGCTGAGAGCCTGACTCAGTGAATGCTCCATGATCCTCAAAGCC  
 20 30  
 T A D Q E V P E K P D S V T P M I L K A  
 190 200 210 220 230 240  
 CAGAAAGGGGGCAACCTGGAAGCCAAAGATCACCATGCTGACAAATGGTCAGTGCCAGAAC  
 40 50  
 Q K G G N L E A K I T M L T N G Q C Q N  
 250 260 270 280 290 300  
 ATCACGGTGGTCCCTGCACAAACCTCTGAGCCTGGCAAAATACACGGGCATACGAGGGCCAG  
 60 70  
 I T V V L H K T S E P G K Y T A Y E G Q

Fig. 5A

[図 5 B]

```

310      320      330      340      350      360
CGTGTGTTTCATCCAGCCGTCCTCCCGGTGAGGACCACACTACATTCCTCTACTGCGAGGGC

      80      90
R V V F I Q P S P V R D H Y I L Y C E G

370      380      390      400      410      420
GAGCTCCATGGGAGGCAGATCCGGAATGGCCCAAGCTTCTGGGAAGGGATCCTGAGCAGAGC

      100      110
E L H G R Q I R M A K L L G R D P E Q S

430      440      450      460      470      480
CAAGAGCCCTTGGAGGATTTTCGGGAATTCCTCAAGAGCCCAAGGATTGAACCCAGGAGATT

      120      130
Q E A L E D F R E F S R A K G L N Q E I

490      500      510      520
TTGGAACCTGCGCAGAGCGAAACCTGCTCTCCAGGAGGACAGTAG

      140
L E L A Q S E T C S P G G Q -

```

Fig. 5B

【図 6 A】

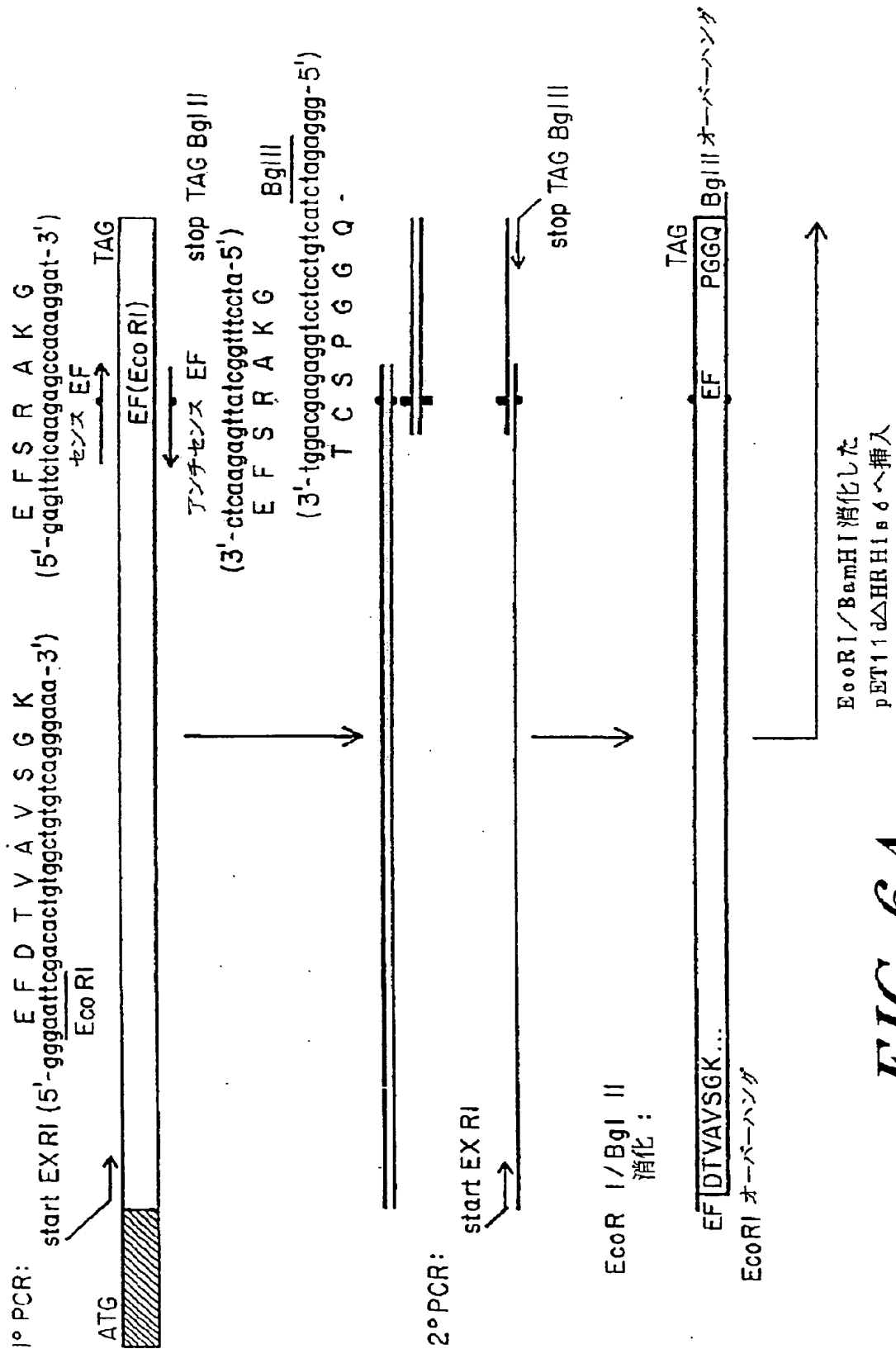


FIG. 6A

【図6B】

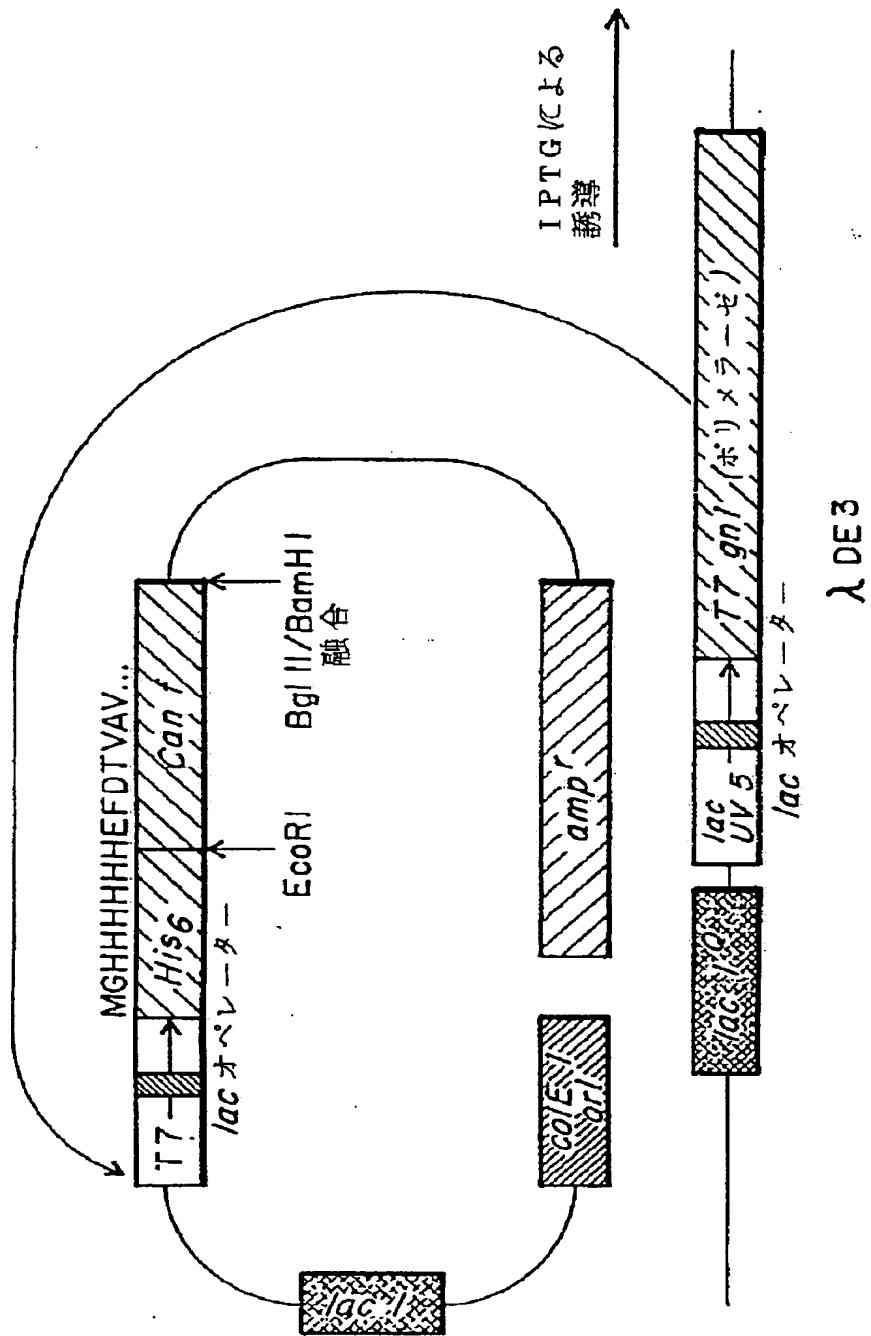
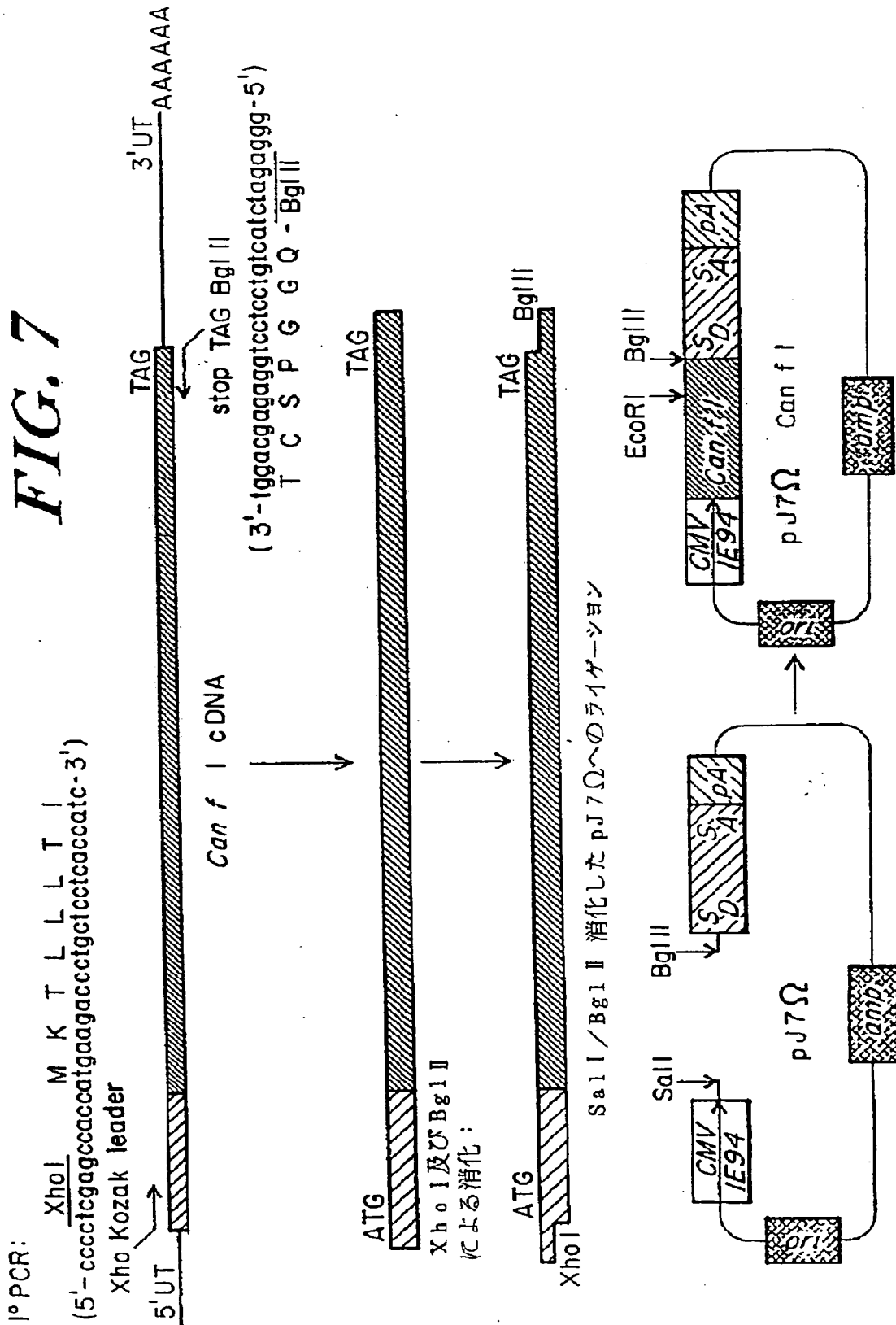


FIG. 6B

【図 7】





【図 9】

コンピュータ操作のパラメーターの設定

K-タプルバリエー: 1  
ギヤツアパナルテイー: 30  
ウインドウサイズ: 5  
フイルタリゲンベル: 2.5  
オーブンギヤツアコスト: 25  
ユニツトギヤツアコスト: 25

他のパラメーターの設定

3つの蛋白質配列について整列を行なった。  
整列中の位置が完全に保存されていることを示す記号:  
位置がよく保存されていることを示す記号: \, \prime

整列

CANF1	DTVAVSGKWYLKAMTADQEVPEKPDSTVTPMILKAQKGGNLEAKITMLTNG	50
2CANF1	DTVAVSGKWYLKAMTADQEVPEKPDSTVTPMILKAQKGGNLEAKITMLTNG	50
3CANF1	-----PEKPDSTVTPMILKAQKGGNLEAKITMLTNG *****	30
CANF1	QCQNITVVLHKTSEPGKYTAYEGQQRVVFIQSPVDRYILYCEGDLLPQA	100
2CANF1	QCQNITVVLHKTSEPGKYTAYEGQQRVVFIQSPVDRYILYCEGELHGR-	99
3CANF1	QCQNITVVLHKTSEPGKYTAYEGQQRVVFIQSPVDRYILYCEGELHGRQ *****	80
CANF1	HLHPSCHHSLLOAHRLLLPHKKLLQGDPQVQWFSACLGLRA	145
2CANF1	QIRMAKLLGRDPEQAHRLLLPHKKLLQGDPQVQWFSACLGLRA	144
3CANF1	IRMAKGLNQEILELAQS-----ETCSPGGQ * ..*	105

共通の長さ: 145  
一致: 76 (52.4%)  
類似: 7 (4.8%)

Fig. 9

【図10】

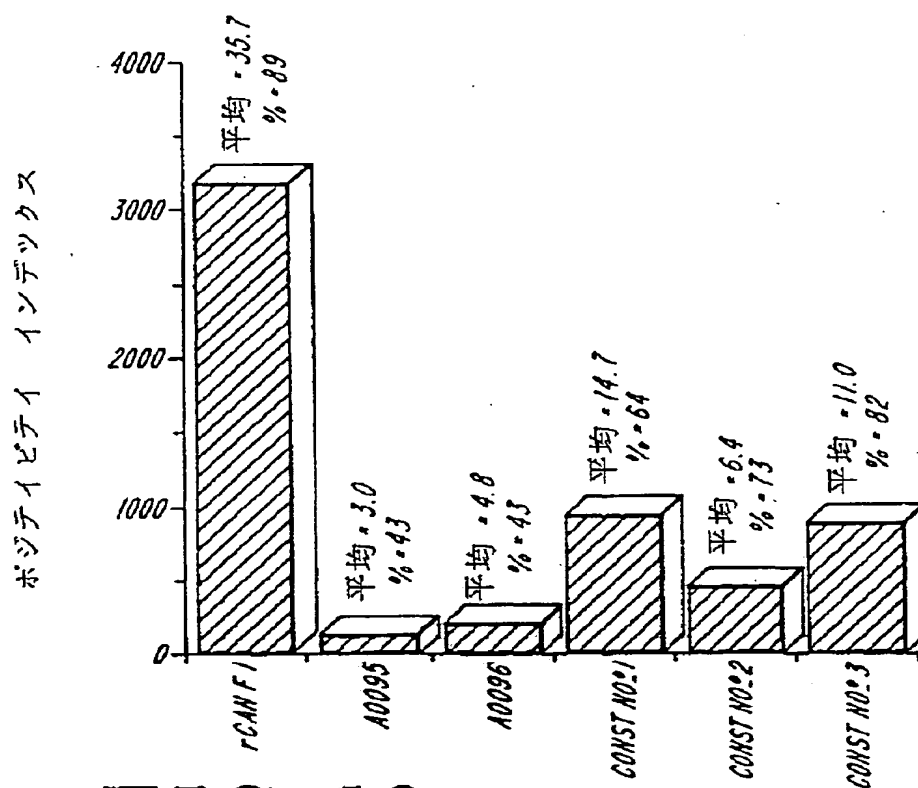
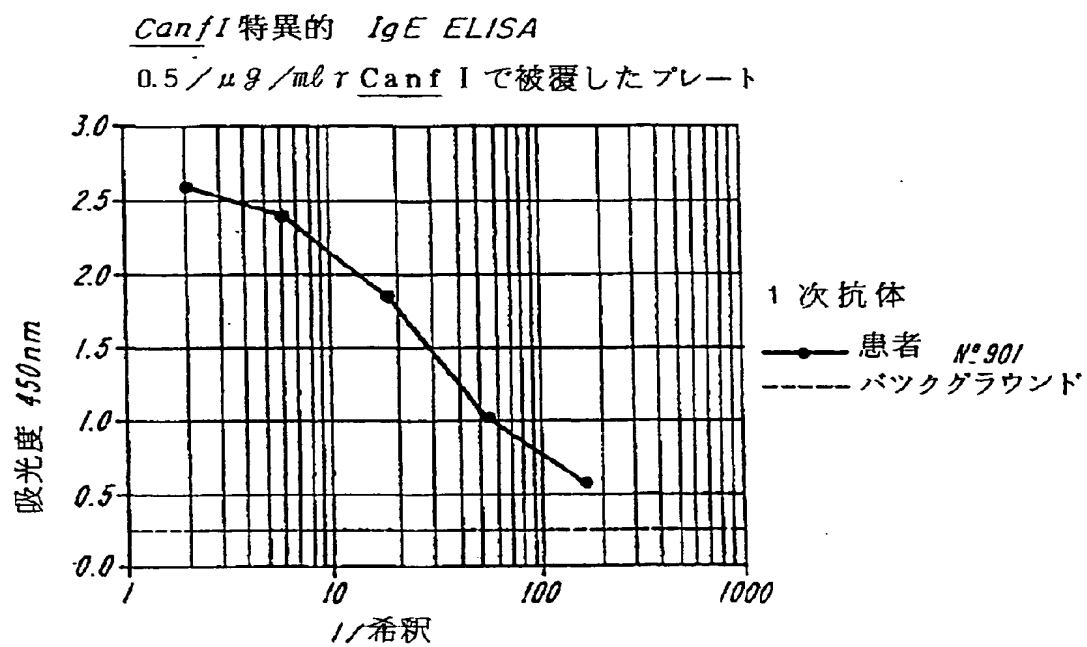


FIG. 10



【図11】

**FIG. 11**

【図12】

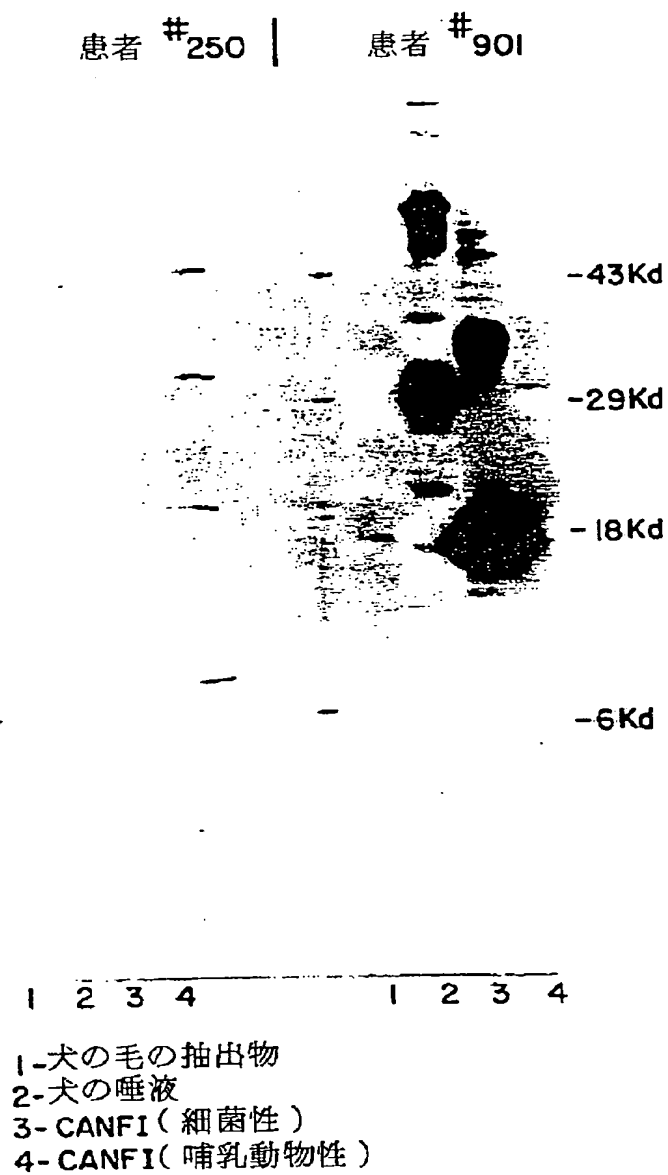
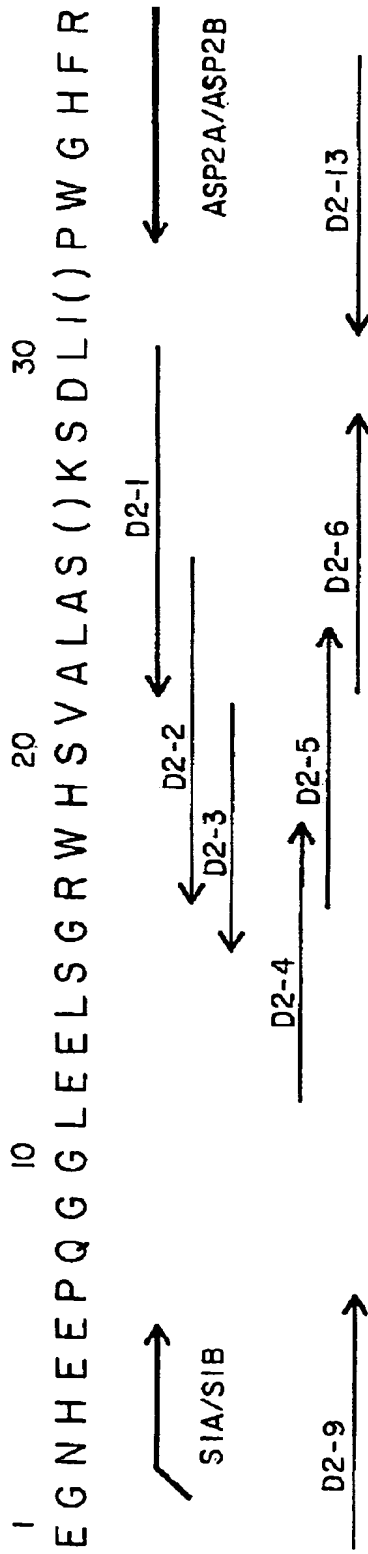


Fig. 12

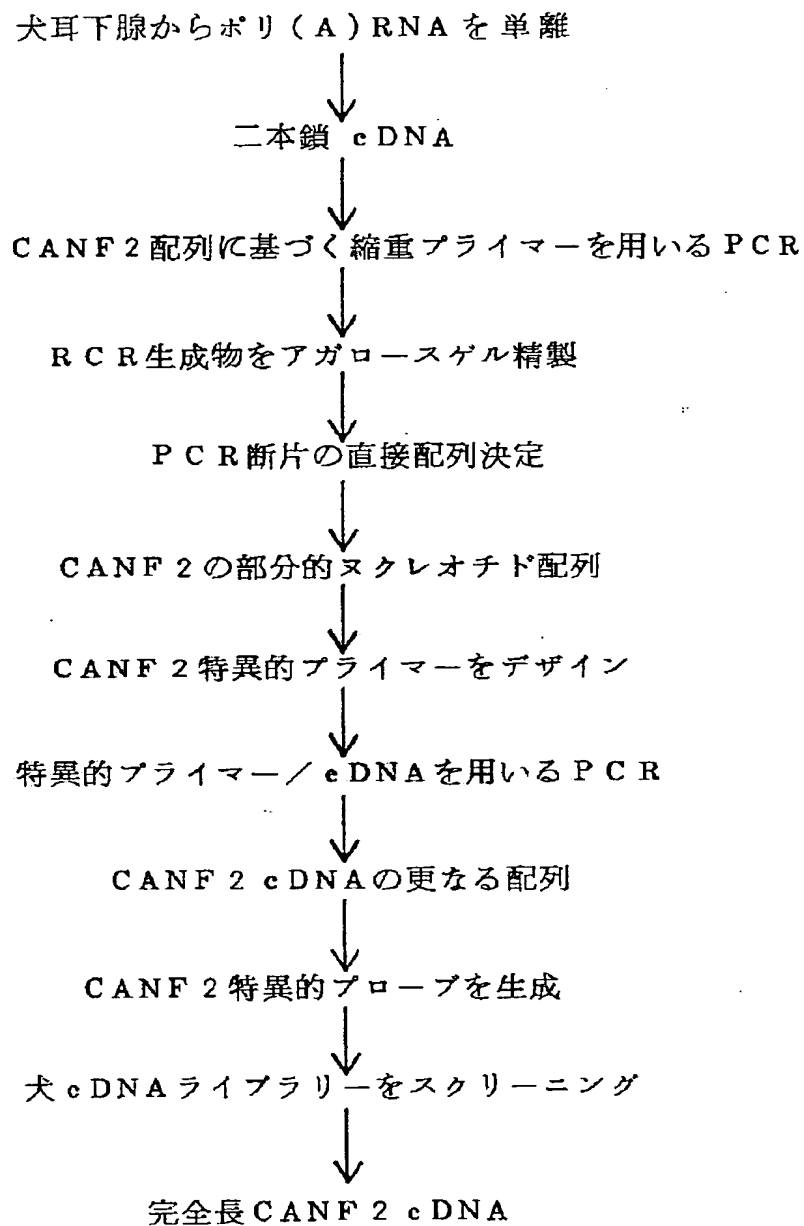
[图 13]



SIA: 5'-GGGAAATTCAA(TC)CA(TC)GA(AG)GA(AG)-3'  
 SIB: 5'-GGGAATTCAA(TC)GA(TC)GA(AG)GA(AG)-3'  
 ASP2A: 5'-(CGT)CG(GA)AA(GA)TG(CTGA)CC CCA(GATC)GG-3'  
 ASP2B: 5'-(CT)CT(GA)AA(GA)TG(CTGA)CC CCA(GATC)GG-3'  
 D2-1: 5'-GGGGGGATCC CAG ATC GGA CTT ATT GGA GGC-3'  
 D2-2: 5'-GGGGGGATCC GGA GGC CAG GGC AAC GGA-2'  
 D2-3: 5'-GGGGGGATCC AAC GGA GTG CCA CCT CCC-3'  
 D2-4: 5'-GGGGGGAATTC GAG GAG CTG TCT GGG AGG TGG-3'  
 D2-5: 5'-GGGGGGAATTC AGG TGG CAC TCC GTT GCC CTG-3'  
 D2-6: 5'-GGGGGGAATTC GCC CTG GCC TCC AAC AAG TCC-3'  
 D2-9: 5'-GGGGGGAATTC GAG GGA AAC CAT GAG GAG CC-3'  
 D2-13: 5'-GGGGGATCC AA GTG CCC CCA GGG TTT GAT-3'

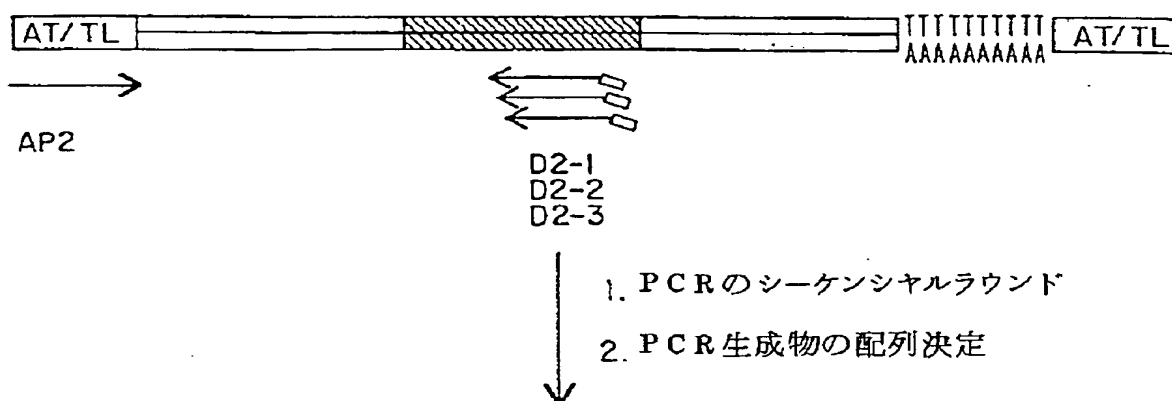
FIG. 13

【図14】

**FIG. 14**

【図15A】

プライマー／アダプターを伴う犬 ds cDNA

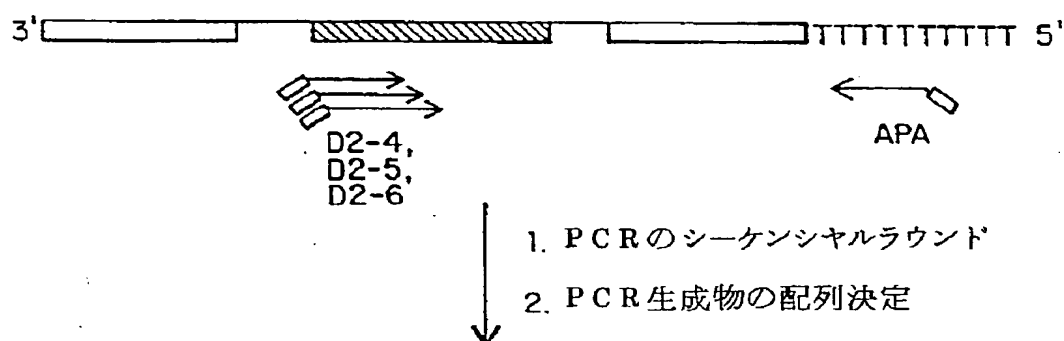


I C G L Q A Q E Q N H E E P Q  
ATCTGTGGCCTCCAGGCTCAGGAGGGAAACCATGAGGAGCCCCAGGG cDNAの5'部分

*FIG. 15A*

【図15B】

犬 ss cDNA



犬 cDNAの3'部分 K P W G H F R V F I H S M S A  
AAACCTGGGGGCACTTCAGGGTTTTCATCCACAGCATGAGCGCA

*FIG. 15B*

【图 16】

AP2 5' GGG TCT AGA GGT ACC GTC CG 3'  
 AT/AL: 5' GGG TCT AGA GGT ACC GTC CGA TCG ATC ATT 3'  
 TAGC TAG TAAP 5'  
 G  
 C  
 3'- T

APA 5'-GGG CTC GAG GTC GAG TTT TTT TTT TTT TT (GAC)  
 D2-1: 5'-GGGGGATCC CAG ATC GGA CTT ATT GGA GGC-3'  
 D2-2: 5'-GGGGGATCC GGA GGC CAG GGC AAC GGA-2'  
 D2-3: 5'-GGGGGATCC AAC GGA GTG CCA CCT CCC-3'  
 D2-4: 5'-GGGGGAATTC GAG GAG CTG TCT GGG AGG TGG-3'  
 D2-5: 5'-GGGGGAATTC AGG TGG CAC TCC GTT GCC CTG-3'  
 D2-6: 5'-GGGGGAATTC GCC CTG GCC TCC AAC AAG TCC-3'  
 D2-9: 5'-GGGGGAATTC GAG GGA AAC CAT GAG GAG CC-3'  
 D2-11: 5'-GGA CTT GTT GGA GGC CAG GGC-3'  
 D2-12: 5'-GGGGGAATTC ATC AAA CCC TGG GGG CAC TT-3'  
 D2-13: 5'-GGGGGATCC AA GTG CCC CCA GGG TTT GAT-3'  
 D2-17: 5'-CAC GGG GAT ATC CTT ATA CC-3'  
 D2-19: 5'-G TAC AAC GAT GAC ACC AG-3'  
 D2-20: 5'-TGT CCC CCG AGC CTA T-3'  
 D2-23: 5'-TC CTA CTG CTG ACC GTG G-3'

Fig. 16

【图17】

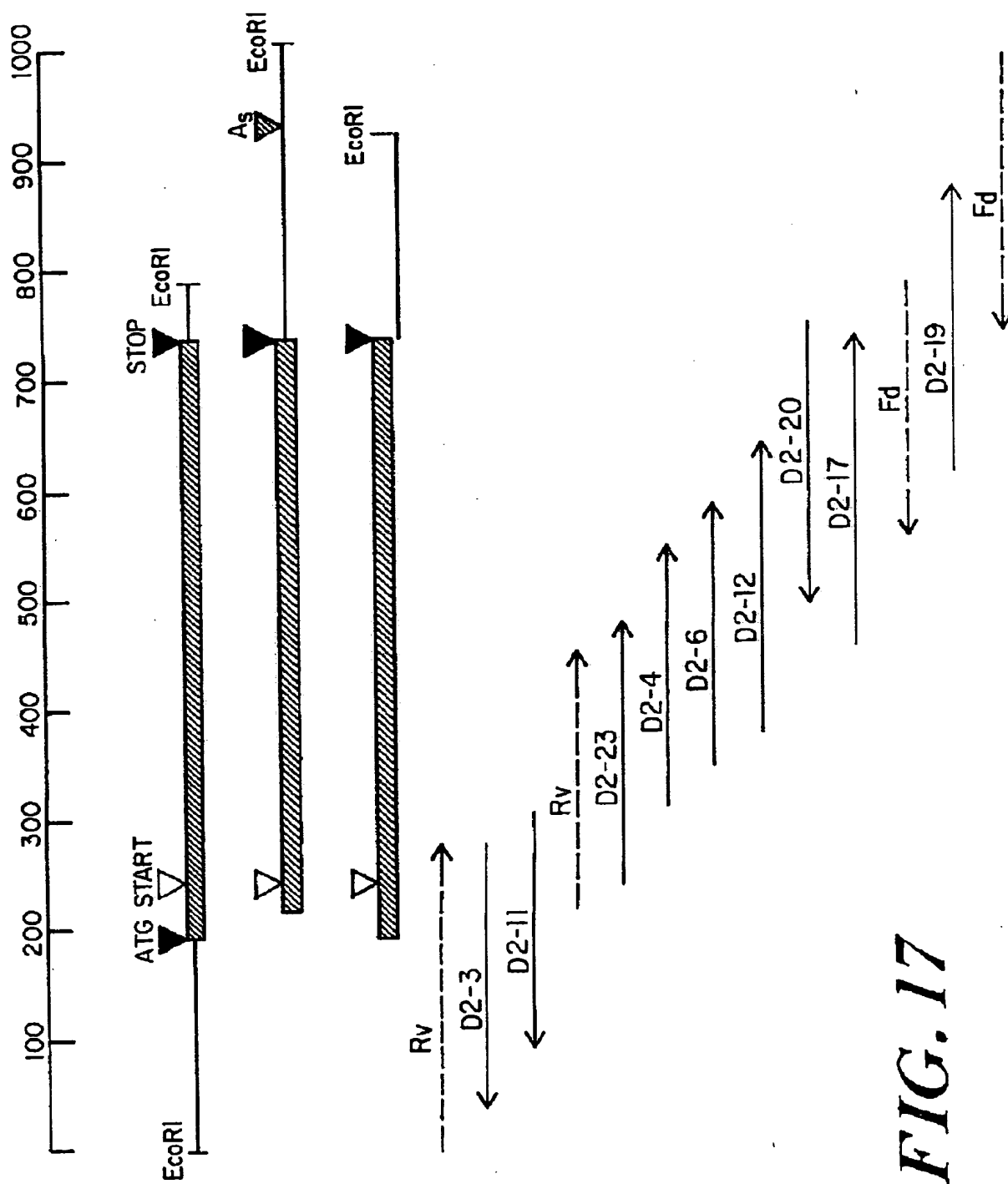


FIG. 17

[図18A]

AGAGCTGGACCCGT 15  
 GTGTGTGCTGGCCAATGAGCCCTGGAGGGTCCGGCTCCAGAGTACCCTCTTGGCACAGGG 75  
 CCGAGTCCATCGGACAGATGAACCTAGAGGACTCCACTGCCCTCCCATCCACGGGGCCG 135  
 GGTCACCAGACTCTGCAAGTCTCCAGCTGTGCGCAACCCAGACAGAGGTGCTGTGGAC 195

ATGCAGCTCCTACTGCTGACCGTGGGCGCTGGCACTGATCTGTGGCCCTCCAGGCTCAGGAG 255  
 M Q L L L L T V G L A L I C G L Q A Q E 1  
 -19

GGAAACCATGAGGAGCCCCAGGAGGCCCTAGAGGAGCTGTCTGGGAGGTGGCACTCCGTT 315  
 G N H E E P Q G G L E E L S G R W H S V 20  
 10

GCCCTGGCCTCCAACAAGTCCGATCTGATCAAACCCCTGGGGCACTTCAGGGTTTTCATC 375  
 A L A S N K S D L I K P W G H F R V F I 40  
 30

CACAGCATGAGCGCAAGGACGGCAACCTGCAACGGGGATATCCTTATACCGCAGGACGGC 435  
 H S M S A K D G N L H G D I L I P Q D G 60  
 50

FIG. 18A



[図18B]

CAGTGGAGAAAGTCTCCCTCACTGCGTTCAAGACTGCCACCCAGCAACAAATTTGACCTG 495  
 Q C E K V S L T A F K T A T S N K F D L 80  
 70  
 GAGTACTGGGGACACAATGACCTGTACCTGGCAGAGGTAGACCCCAAGAGCTACCTGATT 555  
 E Y W G H N D L Y L A E V D P K S Y L I 100  
 90  
 CTCTACATGATCAACCAGTACAACGATGACACCCAGCCTGGTGGCTCACTTGATGGTCCGG 615  
 L Y M I N Q Y N D D T S L V A H L M V R 120  
 110  
 GACCTCAGCAGGCAGGACTTCCTGCGGCATTGCAATCTGTATGTGAAGACATCGGT 675  
 D L S R Q Q D F L P A F E S V C E D I G 140  
 130  
 CTGCACAAGGACCAGATTGTGGTTCTGAGCGATGACGATCGCTGCCAGGGTTCCAGAGAC 735  
 L H K D Q I V V L S D D D R C Q G S R D 160  
 150  
 TAGGGCCTCAGCCACGCAGAGAGGCCAAGCAGCAGGATCTCACCTGCCCTGAGTACGGT 792  
 \*

FIG. 18B

【図19】

rCanf2 と天然物との整列

rCanf2	MQLLLLTVGL	ALICGLQAE	GNHEEPQGG	EELSGRWHSV	ALASNKSDLI	50
天然CANF2	-----	-----E	GNHEEPQGG	EELSGRWHSV	ALASNKSDLI	31
rCanf2	KPWGHFRVFI	HMSAKDGNL	HGDILIPQG	QCEKVSLTAF	KTATSNKFDL	100
天然CANF2	KPWGHFR---	-----	-----	-----	-----	38
rCanf2	EYWGHNLDYL	AEVDPKSYLI	LYMINQYND	TSLVAHLMVR	DLRQQDFLP	150
天然CANF2	-----	-----	-----	-----	-----	38
rCanf2	AFESVCEDIG	LHKDQIVVLS	DDDRCCGSRD			180
天然CANF2	-----	-----	-----			38

Fig. 19

【図20】

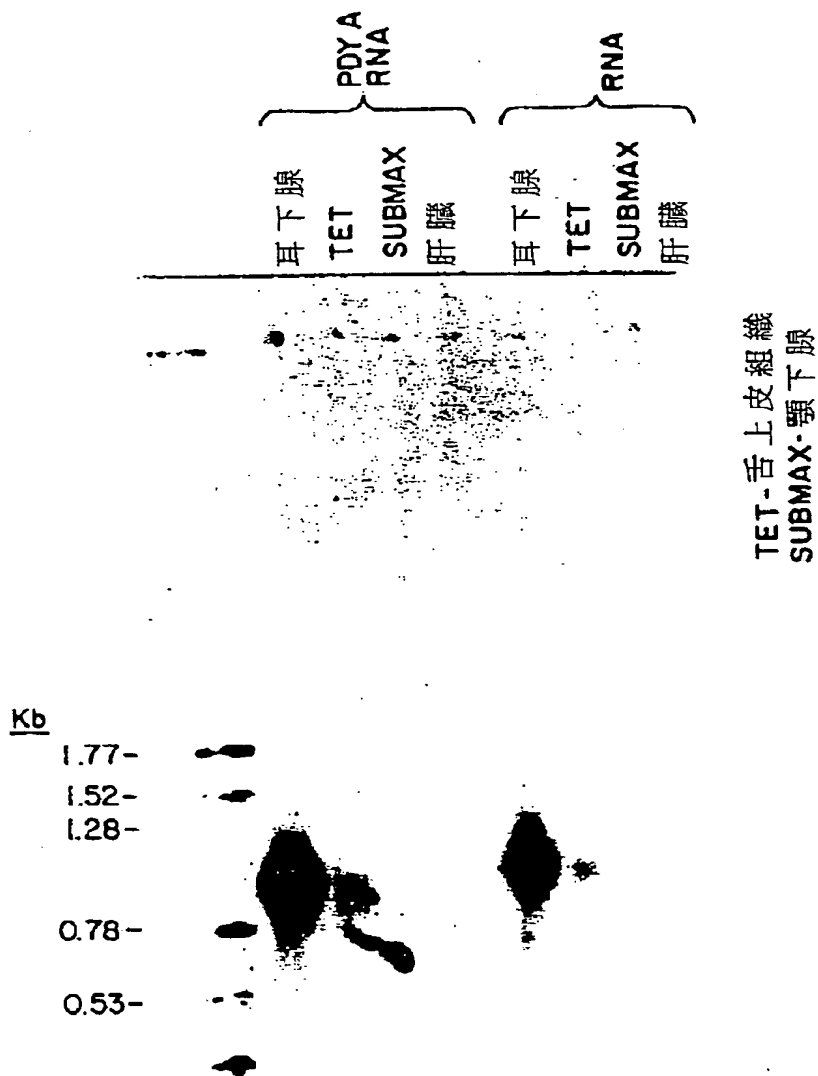


Fig. 20

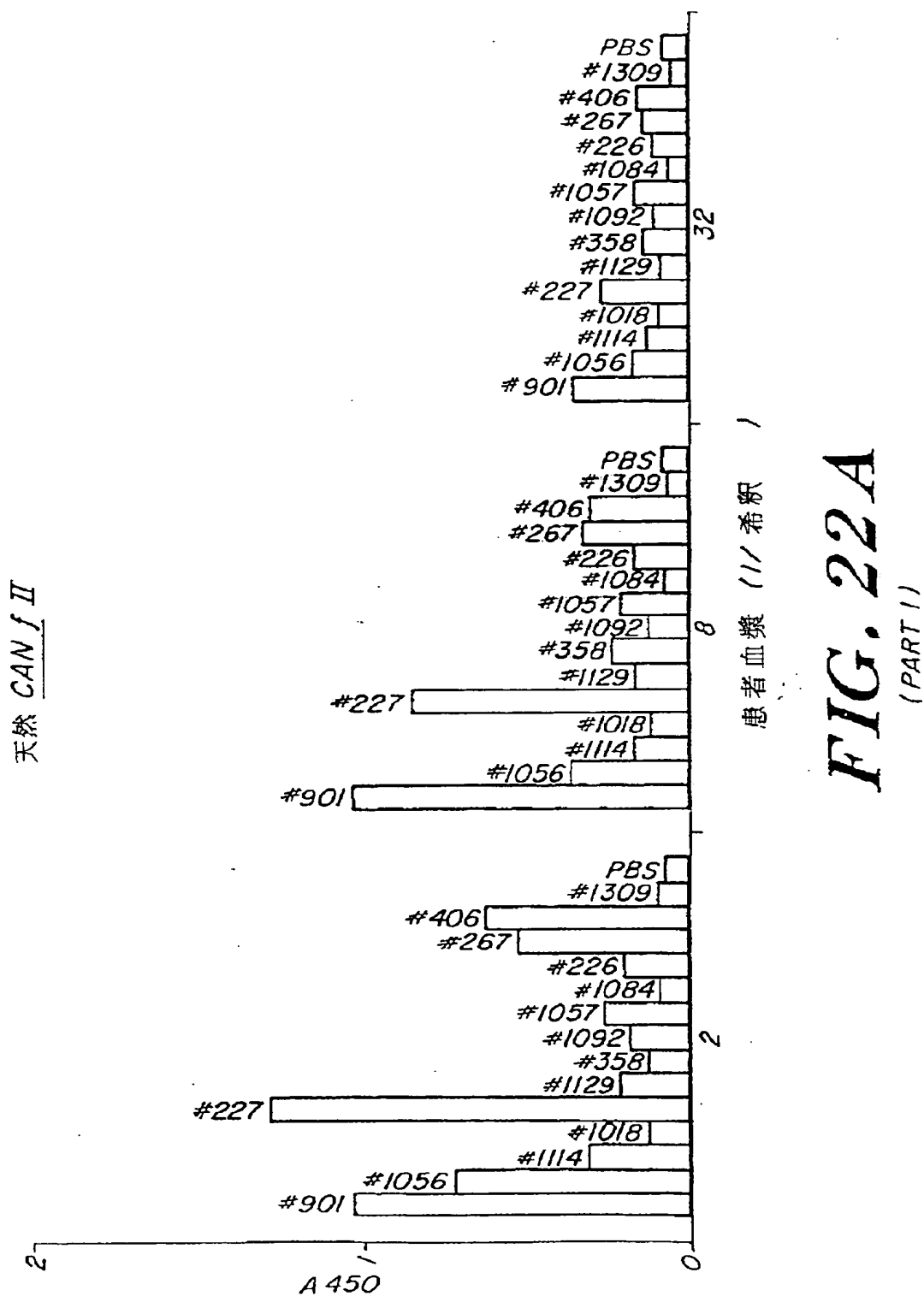
【図 21】

## UNTITLED-2 FORMATTED ALIGNMENT

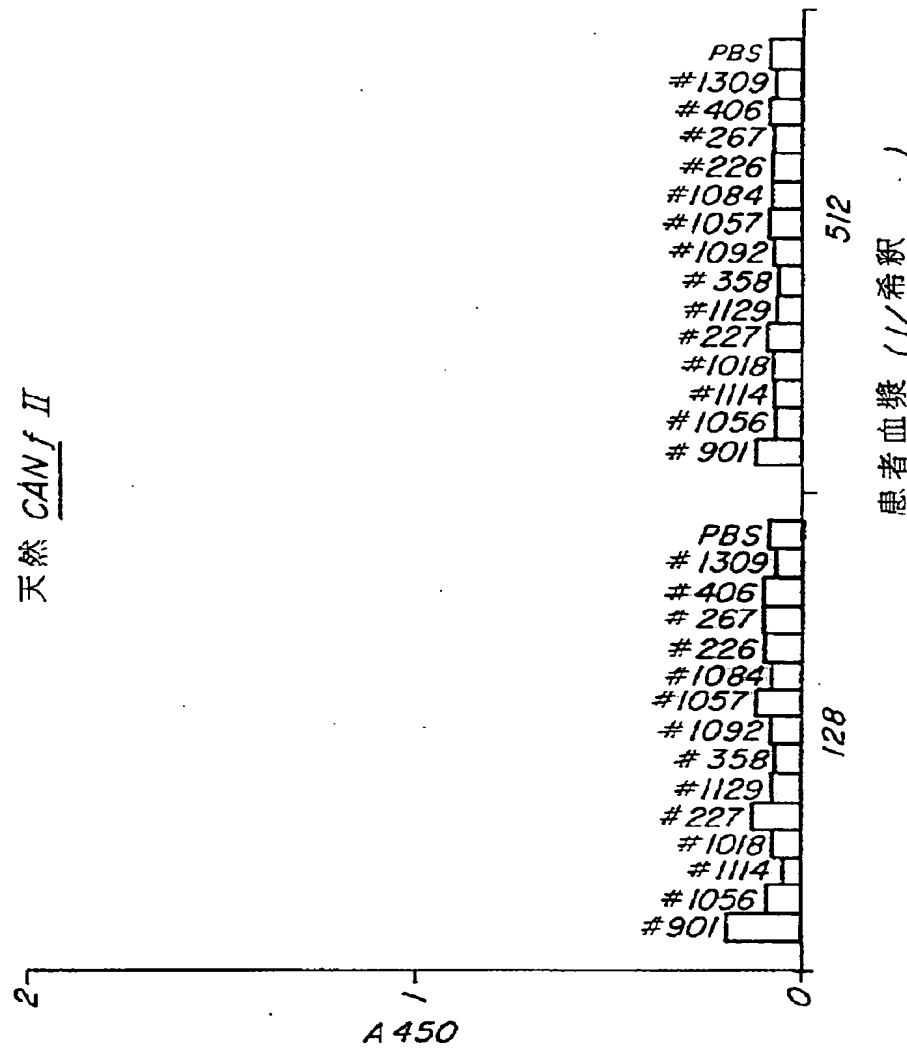
Canf 2	MQ--LLLLTV	GLALICGLQA	QEGNHEEPQG	GLEELSGRWH	SVALASNKSD	48
ラット A2U	MKLLLLLLCL	GLILVC-GHA	EEANSERGNL	DVDKINGDWF	SIVVASNKRE	49
MUP6_マウス	MK-MLLLLCL	GLILVC-VHA	EEASSTGRNF	NVEKINGEWH	TIILASDKRE	48
Canf 2	LTKPWGHRV	FIHMSAKDG	NLHGDILIPQ	DGQCEKVSIT	AFKATATSNKF	98
ラット A2U	KIEENGSMRV	FMQHDVLEN	SLGFKLCIKE	NGECKRLYSV	AYKTPKIGEY	99
MUP6_マウス	KIEDNGNFR	FILEQIHVLEN	SLVLKFTVR	DEECSELSMV	ADKTEKAGEY	98
Canf 2	DLEYWGHNDL	YLAEVDPKSY	LILYMLNQYN	DDTSLVAHLM	VRDLSRQQDF	148
ラット A2U	FLEYDGGNTF	TILKTDYERY	VMFHLYNVNN	GEAFQLMELY	GRTKDLSSDI	149
MUP6_マウス	SVTYDGFNTF	TIPKTDYDNF	LMAHLINERD	GETFQLMGILY	GREPDLMSTI	148
Canf 2	LPAFESVCE	IGLHKDQIVV	LSDDDRCCQS	RD		180
ラット A2U	KERFAKLCEA	HGILTRNDID	LTKTDRQLQA	RG		181
MUP6_マウス	KERFAQLCEE	HGILRENID	LSNANROLQA	RE		180

Fig. 21

【図22A】



【図22A】



**FIG. 22A**  
(PART 2)

【図22B】

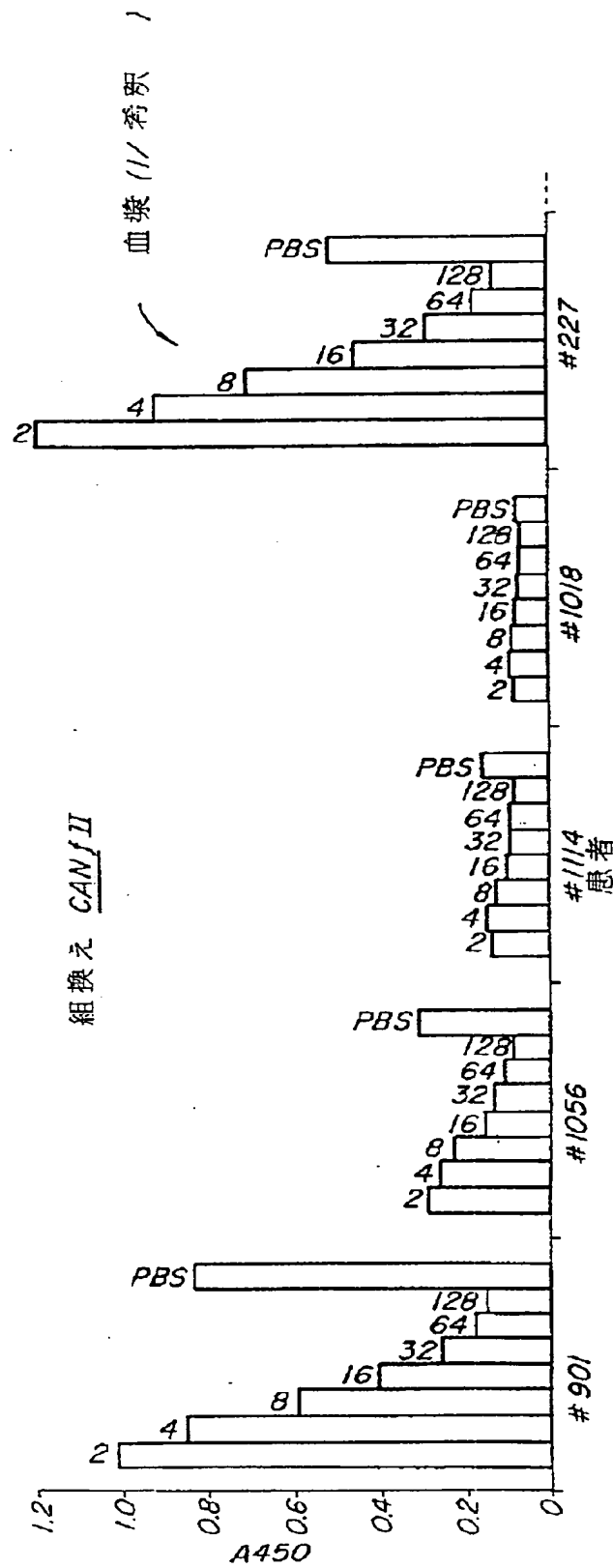
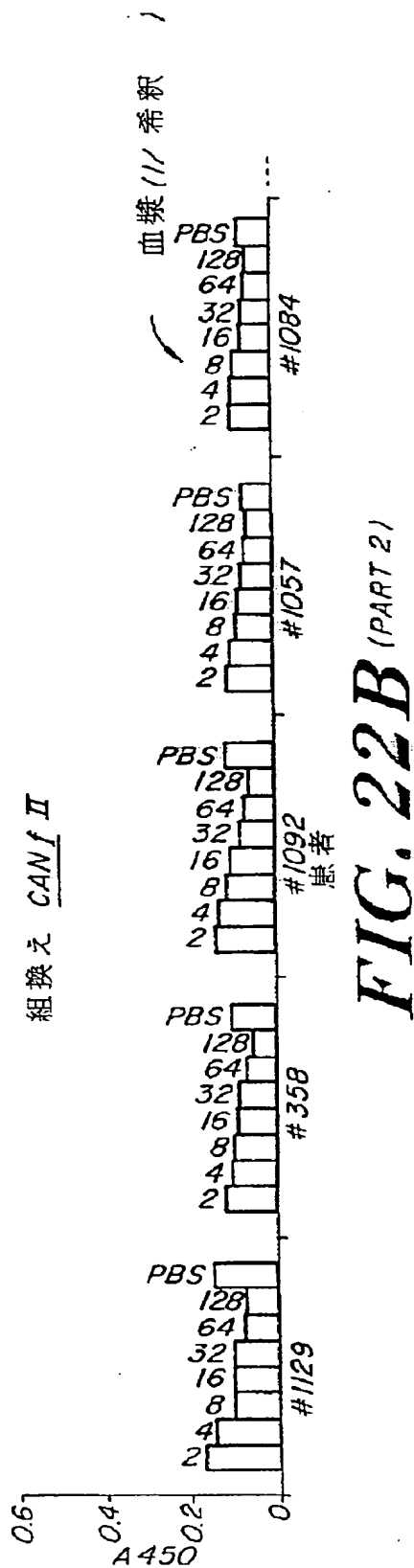


FIG. 22B (PART 1)

【図22B】





【図22B】

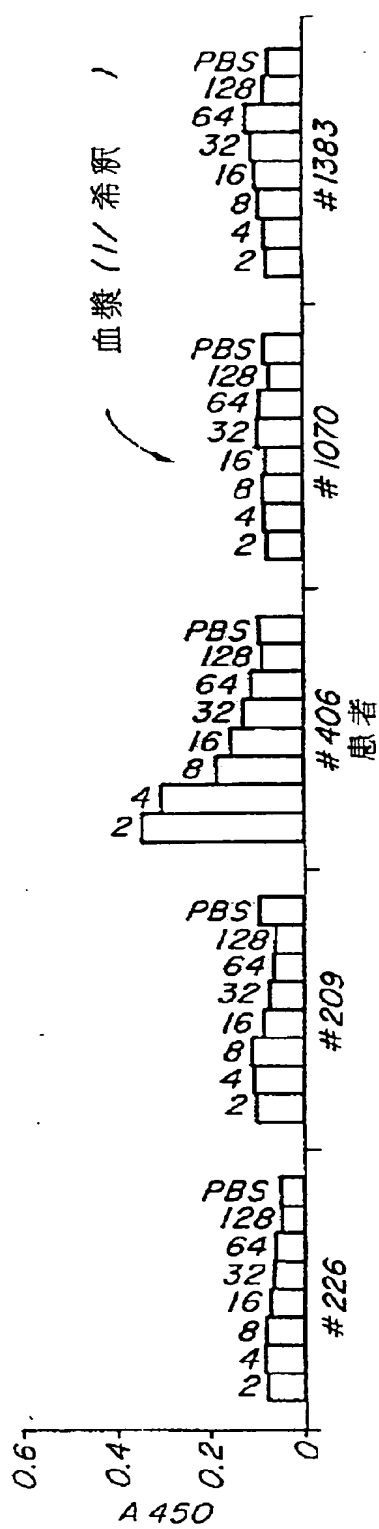
組換え *CAN f II*

FIG. 22B (PART 3)

【図 2 2 C】

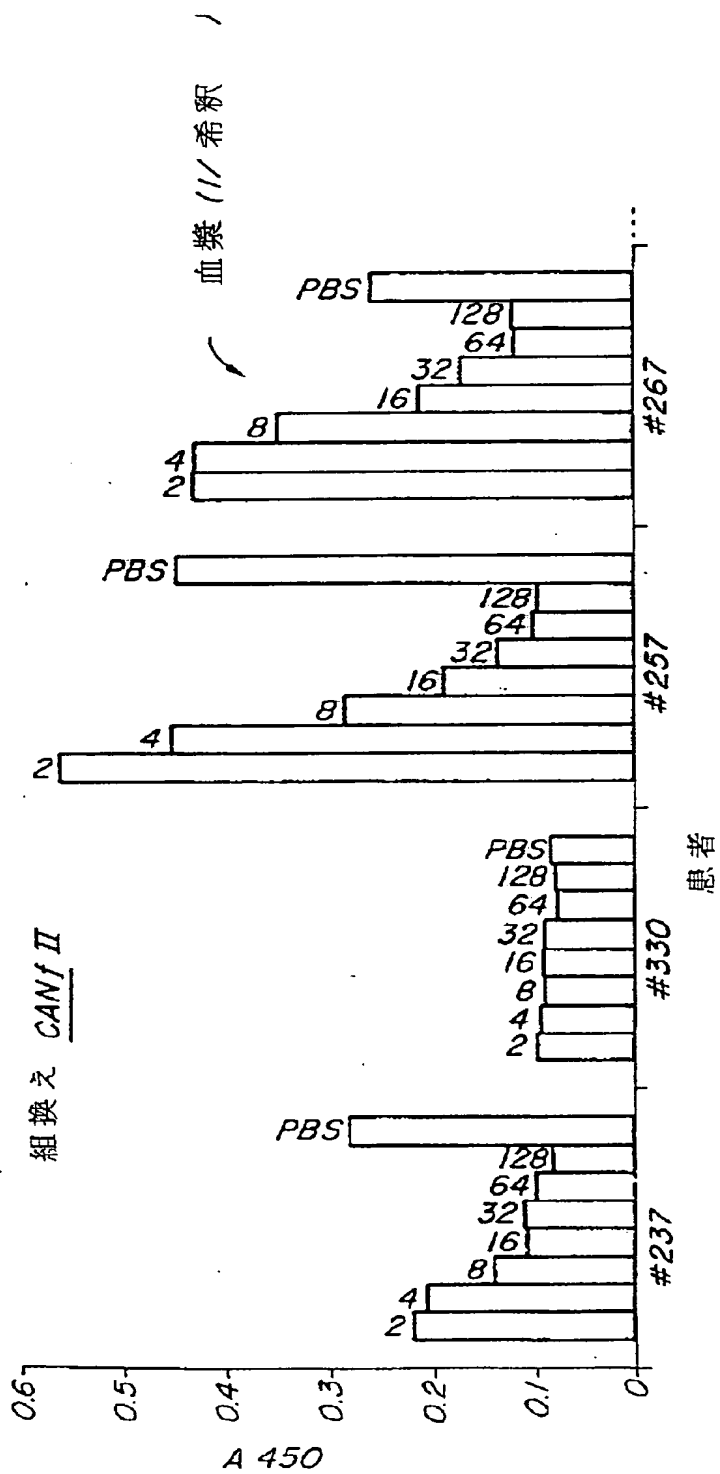
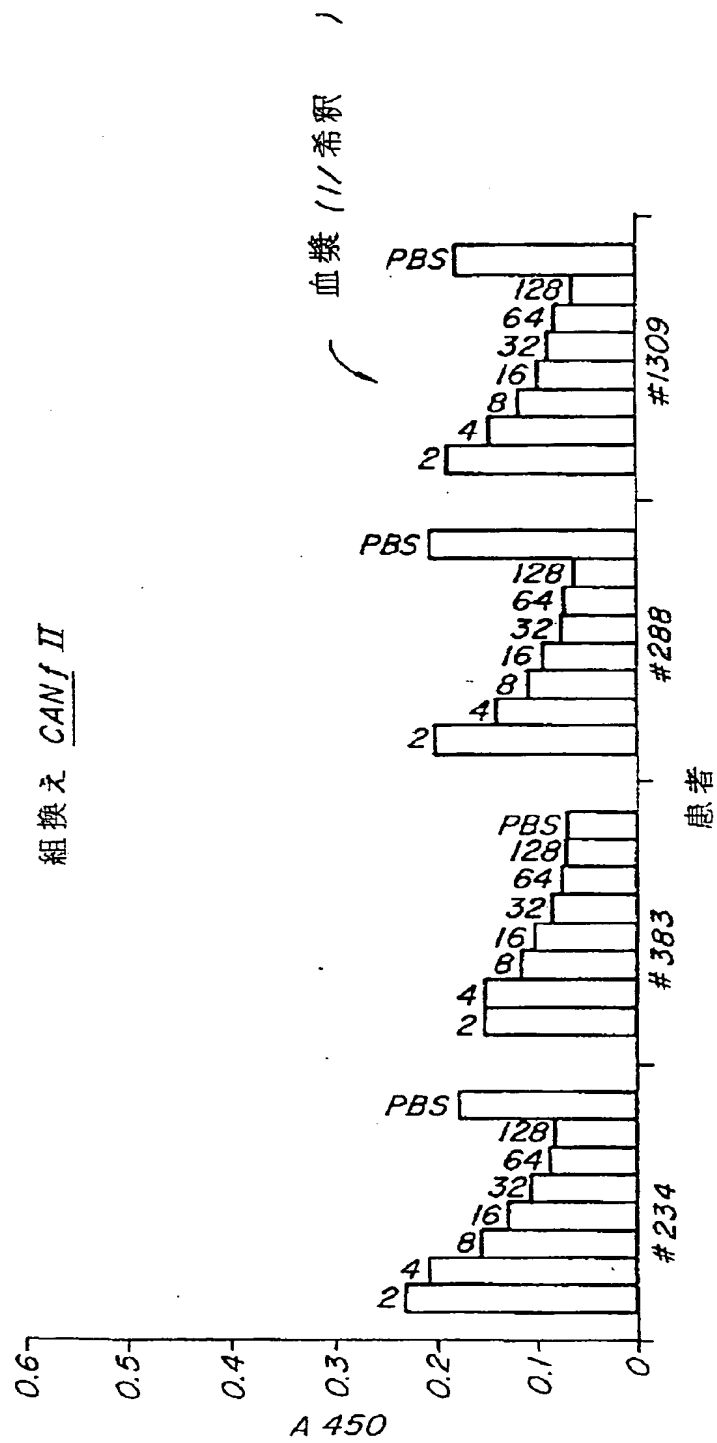


FIG. 22C  
(PART 1)

【図22C】

FIG. 22C  
(PART 2)

[illegible]

Fig. 23A

Fig. 23B

[illegible]

345  
546  
349  
550

GTACTGGGGA CACAATGACC TGTACCTGGC AGAGGTAGAC CCCAAGAGCT

la cons  
lc cons  
lj cons  
コンセンサス

395	.....	.....	.....	.....	.....	.....
596	.....	.....	.....	.....	.....	.....
399	.....	.....	.....	.....	.....	.....
600	ACCTGATTCT	CTACATGATC	AACCAGTACA	ACGATGACAC	CAGCCTGGTG	

la cons  
lc cons  
lj cons  
コンセンサス

C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
GCTCACATGA	TGGTCCGGA	CCTCAGCAG	CAGCAGGACT	TCCTGCCCGGC									

la cons  
lc cons  
lj cons  
コンセンサス配列

.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
ATTCGAATCT	GTATGTGAAG	ACATCGGTCT	GCACAAGGAC	CAGATTGTGG	700	

la cons  
lc cons  
lj cons  
コンセンサス配列

[illegible]

la cons  
lc cons  
lj cons  
コンセンサス配列

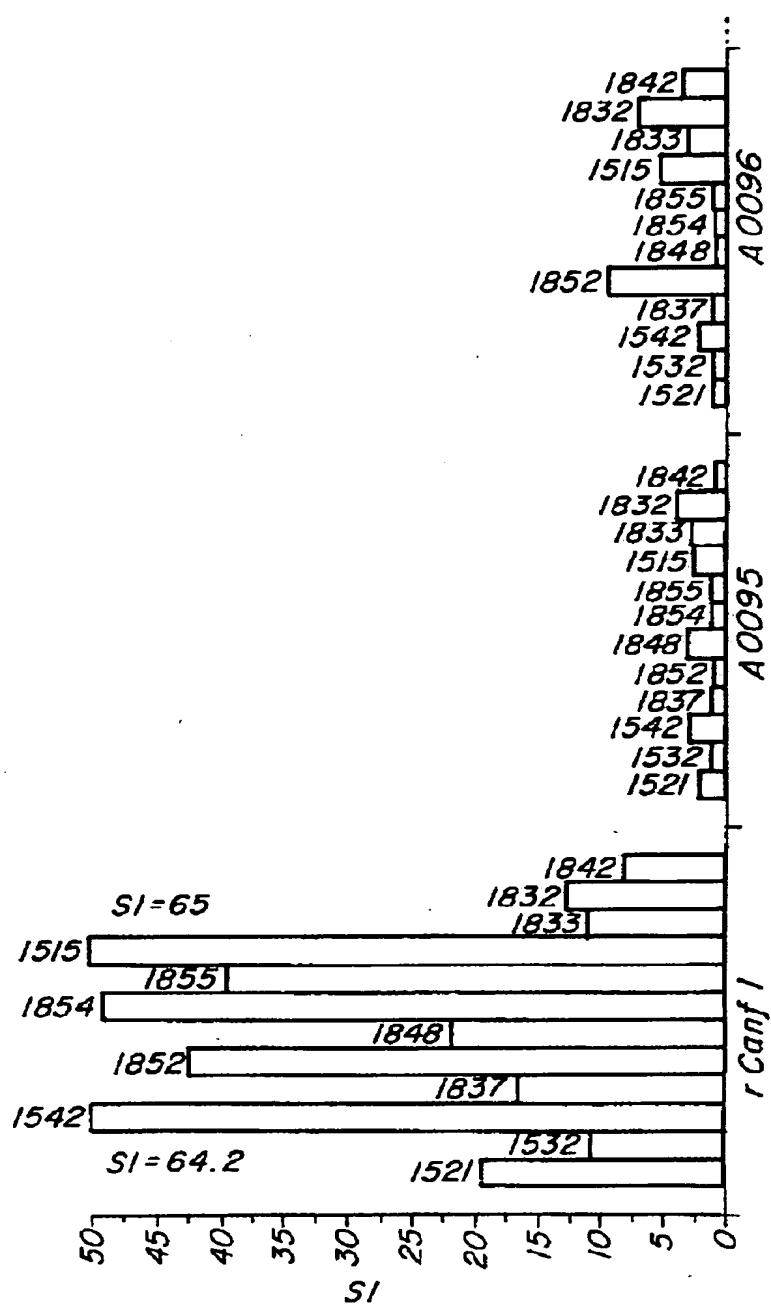
Fig. 23C

【図 23 D】

la cons	T.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	595
lc cons	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	785
lj cons	C.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	599
コンセンサス配列	CYACGCAGAG	AGCCAAGCAG	CAGGATCTCA	CCTGCCCTGAG	GACTCAGACC				800
la cons	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	645
lc cons	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	791
lj cons	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	649
コンセンサス配列	TATAGGCTCG	GRGGACACCG	TACTCAGCTC	TGCGTCCCTC	TCTGCCGAACC				850
la cons	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	695
lc cons	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	791
lj cons	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	699
コンセンサス配列	CTCCAGGTGA	TCCCAGCAAC	AACACCCACC	TGCGCTTCCA	TGTGCGGCCC				900
la cons	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	745
lc cons	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	791
lj cons	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	749
コンセンサス配列	TGTCACGCCT	GGGCCCACTC	CCTGCCTGGG	CAGCCACACA	CTCCCCAGCC				950
la cons	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	793
lc cons	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	791
lj cons	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	774
コンセンサス配列	CCCTGCTATG	GTCCCTCCTC	GCATAATAAA	GGACATTCCG	TTCAAAAA				998

Fig. 23D

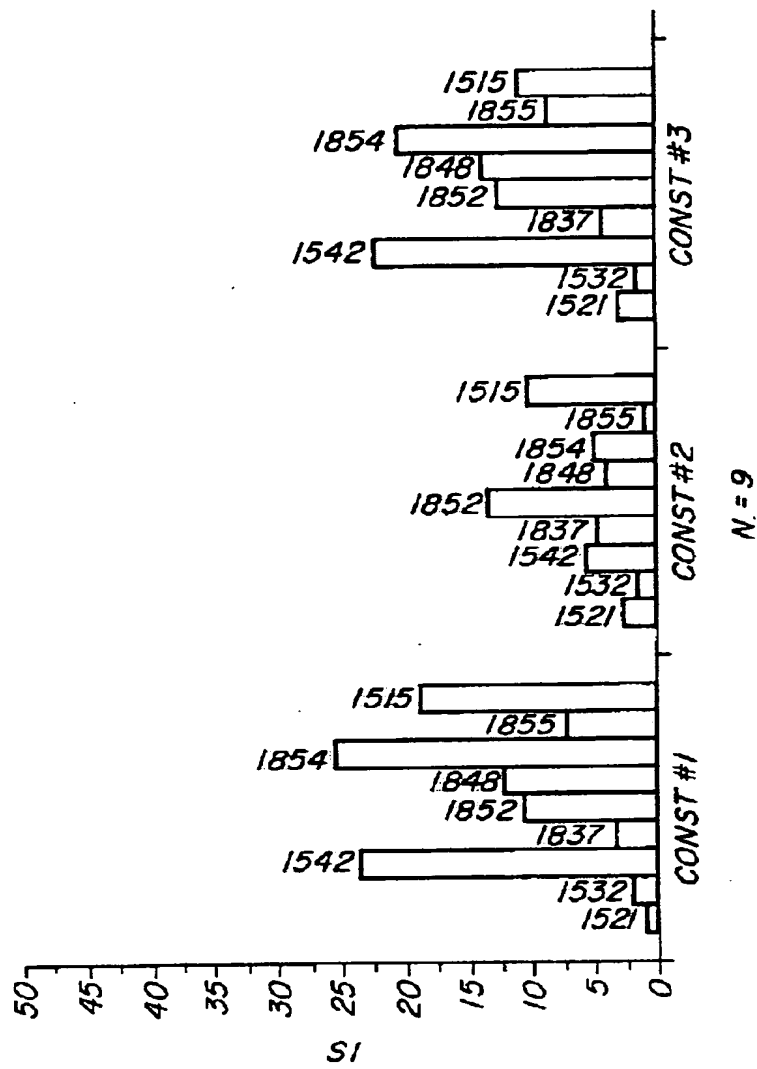
【図24】



$N = 12$   
**FIG. 24**  
 (PART 1)

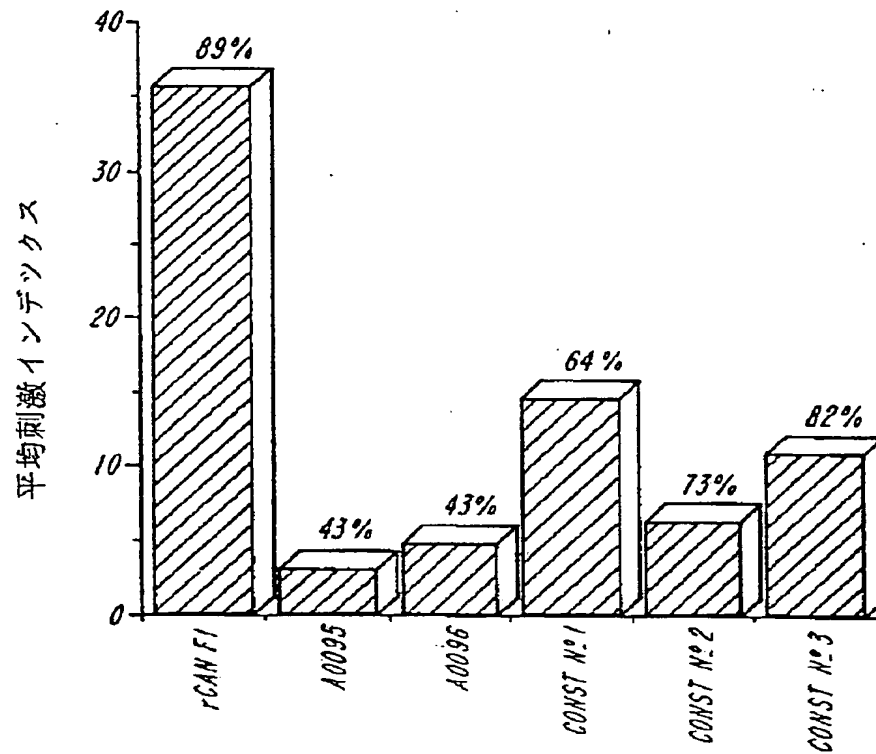


【図 2 4】



**FIG. 24**  
(PART 2)

【図25】

*FIG. 25*

【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter. Application No PCT/US 93/12468		
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 5 C12N15/12 C12N5/10 C12P21/00 C07K15/06 C07K7/04 A61K39/35 C12P21/08		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 5 C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	
	Relevant to claim No.	
X	J. ALLERGY CLIN. IMMUNOL., vol.87, 1991 pages 1056 - 1065 H. DE GROOT ET AL.; 'Affinity purification of a major and a minor allergen from dog extract: serologic activity of affinity-purified Can fI and of Can fI-depleted extract' cited in the application	41-47, 63,73, 74,79-82
Y	*abstract; materials and methods; discussion*	1,2, 7-13,25, 26,31, 32,39, 65,71
---		
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
26 May 1994	14-09-1994	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patendlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl. Fax (+31-70) 340-3016	Authorized officer  Yeats, S	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter national Application No  
PCT/US 93/12468

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CLIN. EXPER. ALLERGY, vol.22, 1992 pages 793 - 803 A.W. FORD AND D.M. KEMENY 'The allergens of dog II. Identification and partial purification of a major dander allergen' *abstract; introduction; discussion*	41-47, 63,73, 74,79,81
Y		1,2, 7-13,25, 26,31, 32,39, 65,71
X	CLIN. EXPER. ALLERGY, vol.21, 1991 pages 321 - 328 C. SCHOU ET AL.; 'Purification and characterization of the major dog allergen, Can fI' cited in the application *abstract; page 322; discussion*	41-47, 63,73, 74,79-82
Y		1,2, 7-13,25, 26,31, 32,39, 65,71
X	J. BIOL. CHEM., vol.267, 1992 pages 20282 - 20287 B. REDL ET AL.; 'cDNA cloning and sequencing reveals human tear prealbumin to be a member of the lipophilic-ligand carrier protein superfamily' *abstract; figure 3*	13
Y	GENE, vol.113, 1992 pages 263 - 268 I.J. GRIFFITH ET AL.; 'Expression and genomic structure of the genes encoding FdI, the major allergen from the domestic cat' *abstract*	1,2, 7-13,25, 26,31, 32,39

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 93/12468

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Remark : Although claims 71 and 72 are directed to a method of treatment of the human body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the composition.
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 93/12468

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see annex

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:  
1-13, 25-27, 31-34, 39, 41-47, 55-58, 63, 65-67, 71-74, 79-82, 87-90  
and 95.

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/US93/12468

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/210

- 1- Claims 1-13, 25-27, 31-34, 39, 41-47, 55-58, 63, 65-67, 71-74, 79-82, 87-90, 95 :  
nucleic acid encoding a dog dander Can fI allergen.
- 2- Claims 14-24, 28-30, 35-38, 40, 48-54, 59-62, 64, 68-70, 75-78, 83-86,  
91-94 : nucleic acid encoding a dog dander Can fII allergen.

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.<sup>6</sup> 識別記号 庁内整理番号 F I

C 1 2 P 21/02 C 9452-4B

21/08 9358-4B

G 0 1 N 33/53 Q 8310-2 J

/(C 1 2 N 1/21

C 1 2 R 1:19)

(C 1 2 P 21/02

C 1 2 R 1:19)

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE,  
DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M  
C, NL, PT, SE), AU, CA, JP, KR, U  
S

(72)発明者 コニエツニ, アンドレイ

アメリカ合衆国 02178 マサチューセッ  
ツ, ベルモント, ウォルナット ストリ  
ート 92

(72)発明者 ビジンカウスカス, クリスティン ビー.

アメリカ合衆国 02122 マサチューセッ  
ツ, ドーチェスタ, キング ストリート  
119

(72)発明者 ブラウア, アンドルー ダブリュー.

アメリカ合衆国 01970 マサチューセッ  
ツ, セイレム, ゲドニー コート 21